

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

Evaluation du stress oxydant chez la crevette tigrée *Penaeus monodon* Fabricius (1798) suite à l'utilisation d'antibiotiques dans les élevages au Viet Nam

Bernard, Amandine

Award date:
2005

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



Facultés Universitaires Notre-dame de la Paix
Namur
Faculté des Sciences

EVALUATION DU STRESS OXYDANT CHEZ LA CREVETTE TIGREE *PENAEUS*
MONODON FABRICIUS (1798) SUITE A L' UTILISATION D' ANTIBIOTIQUES DANS
LES ELEVAGES AU VIET NAM

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Licencié en Biologie
Amandine BERNARD
Septembre 2005

FACULTE DES SCIENCES

Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joëlle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Evaluation du stress oxydant chez la crevette tigrée *Penaeus monodon* Fabricius (1798) suite à l'utilisation d'antibiotiques dans les élevages au Viêt Nam

BERNARD Amandine

Résumé

L'utilisation d'antibiotiques est très répandue dans les élevages de crevettes au Viêt Nam. Toutefois, les effets des antibiotiques sur l'environnement, la santé humaine et les crevettes elles-mêmes sont largement inconnus.

Dans ce travail, des crevettes tigrées (*Penaeus monodon* Fabricius) ont été cultivées en laboratoire au Viêt Nam et contaminées pendant une semaine, suivie de 7 jours de décontamination, par de l'enrofloxacin (quinolone) et de la furazolidone (nitrofurane) mélangés à de la nourriture commerciale à raison de 4g kg⁻¹, conditions proches de celles rencontrées dans les fermes. L'hépatopancréas, les branchies et l'hémolymphe des crevettes ont été récoltés à 0h, 96h et 171h pendant les contaminations et après 24h et 7 jours de décontamination afin d'évaluer le niveau de stress oxydant. L'activité de la glutathion-S-transférase (GST) dans les branchies diminue significativement ($p=0,03$) chez les individus contaminés par la furazolidone (à 171h : de $144,0 \pm 20,5$ (contrôle) à $128,5 \pm 20,7$ nmol CDNB min⁻¹ mg⁻¹ protéines (furazolidone) ; après 7 jours : de $157,1 \pm 26,1$ (contrôle) à $120,4 \pm 20,2$ nmol CDNB min⁻¹ mg⁻¹ protéines (furazolidone)).

Les autres biomarqueurs testés (glutathion peroxydase, glutathion réductase, glucose-6-phosphate déshydrogénase, superoxyde dismutase totale, catalase, glutathion total et le niveau de peroxydation lipidique) ne sont pas affectés par la présence d'antibiotiques dans les aliments.

D'autre part, certains échantillons ont été étudiés par des méthodes d'analyse protéomique afin de détecter la présence de protéines carbonylées. La technique, qui consiste à réaliser des gels 2D (pH 3-11 non linéaire, 12% d'acrylamide), une dérivation au DNPH et un marquage par des anticorps anti DNP-HRP, a permis de mettre en évidence la présence de protéines carbonylées dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée, sans pour autant pouvoir affirmer que ces carbonylations soient dues aux antibiotiques.

Ainsi, le niveau de stress oxydant chez la crevette tigrée ne semble pas fortement affecté par la présence d'enrofloxacin et de furazolidone dans la nourriture. De futures études pourront toutefois tester l'utilisation de l'activité de la GST et de l'état de carbonylation des protéines comme biomarqueurs d'exposition à ces antibiotiques.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Septembre 2005

Promoteur: P.Kestemont

Le voyage réalisé dans le cadre du présent travail a été rendu possible grâce à l'intervention financière du conseil interuniversitaire de la Communauté française de Belgique- Commission universitaire pour le développement- Rue de Namur, 72-74, 1000 Bruxelles-
<http://cud.ciuf.be>

Remerciements

Je tiens à remercier tous ceux qui m'ont aidée lors de la réalisation de ce mémoire:

Le Professeur Patrick Kestemont pour avoir supervisé ce travail;

Le Docteur Frédéric Silvestre pour sa patience et ses conseils précieux;

Un merci tout particulier au Professeur Nguyen Thanh Phuong pour m'avoir si bien accueillie dans son département d'aquaculture et pêcheries (Cân Tho, Viêt Nam) et à Madame Huynh Thi Tú pour son aide bienvenue dans ce magnifique pays;

Le professeur Guy Maghuin-Rogister et Madame Caroline Douny pour avoir réalisé les dosages de résidus d'antibiotiques dans les muscles des crevettes et pour leurs explications sur les techniques utilisées;

Madame Marie-Claire Forget pour son efficacité et sa disponibilité lors des dosages ;

Monsieur Patrice Briol pour l'indispensable mise en page ;

Et enfin merci à ma famille et tous ceux qui m'ont aidé et soutenue durant toute la réalisation de ce travail.

I. Introduction

1. Introduction générale	
2. La crevette tigrée <i>Penaeus monodon</i> Fabricius (1798)	9
2.1 Biologie	9
2.1.1 Description	9
2.1.2 Cycle de vie	9
2.1.3 Répartition géographique de la crevette tigrée	10
2.1.4 Alimentation naturelle	10
2.2 Culture	10
2.2.1 Historique	10
2.2.2 Principales espèces cultivées	11
2.2.3 Différentes méthodes de culture de crevettes au Viêt Nam	11
2.2.4 Principales maladies rencontrées dans les cultures de crevettes	12
2.3 Production et exportation	13
3. Effets de l'aquaculture sur l'environnement	14
3.1 Les antibiotiques	14
3.1.1 Utilisation des antibiotiques	14
3.1.2 Législation	14
3.1.3 Quelques alternatives aux antibiotiques	15
3.2 Effets sur le milieu	15
3.2.1 Destruction des mangroves	15
3.2.2 Résistance aux antibiotiques et persistance dans les sédiments	16
3.3 Cinétiques de contamination et de décontamination chez les crevettes	16
4. Le stress oxydant	19
4.1.1 La carbonylation	20
4.1.2 Stress oxydant chez les crustacés	21
4.1.3 Exemple de stress oxydant suite à une contamination par des polluants	21
4.2 Les biomarqueurs	22
4.2.1 Définitions	22
4.2.2 Les biomarqueurs d'effet ou d'exposition	22
4.3 Biomarqueurs enzymatiques	23
4.3.1 Introduction	23
4.3.2 Les différents biomarqueurs moléculaires	23
4.3.3 Exemple d'activités des biomarqueurs enzymatiques et autres chez différentes espèces de crevettes	27
5. Synthèse de l'introduction	29
6. Objectifs du mémoire	31
II Matériel et méthodes	33
1 Les animaux	33
2 Expositions	33
3 Échantillonnage	34
4 Dosages des biomarqueurs	34
5 Détermination des protéines carbonylées en analyse protéomique	36
6 Dosages des résidus d'antibiotiques dans les muscles	40
7 Analyses statistiques des données	41
III Résultats	43
IV Discussion et perspectives	53
V Conclusions	61
VI Références bibliographiques	63
VII Liste des abréviations utilisées dans ce travail :	71

1. Introduction générale

L'aquaculture de crevettes occupe une place importante dans l'économie du Viêt nam. Une espèce très prisée pour la culture est la crevette tigrée *Penaeus monodon*, notamment en raison de son taux de croissance particulièrement élevé. Malheureusement, les crevettes sont souvent sujettes à des infections bactériennes ou virales telles que la maladie des points blancs, qui peuvent provoquer jusqu'à 100 % de mortalité dans les fermes les plus touchées, rendant invendable toute une récolte, ce qui est source de perte financière chez les cultivateurs.

Pour éviter ces problèmes, les fermiers utilisent de nombreuses substances, sans toutefois connaître leur fonctionnement ni les effets de ces substances, tant sur la santé humaine et animale que sur l'environnement naturel. Les antibiotiques sont fréquemment utilisés, parfois même lorsque les crevettes sont infectées par des virus. Les crevettes destinées à l'exportation peuvent ainsi contenir des résidus d'antibiotiques dans leur chair, parfois même des antibiotiques strictement interdits tels que la furazolidone. Ceci pose évidemment problème lors des exportations.

De plus, très peu d'études ont été réalisées à ce jour sur l'impact des antibiotiques sur la santé des crevettes elles-mêmes ainsi que sur le devenir des résidus d'antibiotiques dans la chair de ces animaux. En particulier, les antibiotiques pourraient être une source de stress oxydant chez les individus contaminés, ce qui pourrait influencer les taux de production dans les fermes. Ce stress éventuel serait dû à la détoxification des antibiotiques dans l'organisme, qui crée notamment des espèces réactives de l'oxygène ou ROS. Celles-ci peuvent réagir avec de nombreuses molécules biologiques : l'ADN, les protéines et les lipides, ces derniers pouvant être peroxydés. Une des modifications des protéines est la carbonylation, qui se produit lorsque des acides aminés sont modifiés de façon irréversible en groupements aldéhyde ou cétone. Les protéines carbonylées peuvent perdre leur fonction et être dégradées.

Différents biomarqueurs de stress oxydant existent. Ils peuvent être utiles lors d'études sur l'effet de la pollution sur les organismes qui vivent dans un milieu contaminé par différentes substances. Mais peu d'études utilisent à ce jour de tels biomarqueurs dans le cadre d'exposition d'organismes aquatiques à des antibiotiques.

Dans le présent travail, nous avons soumis des crevettes élevées en laboratoire à des intoxications chroniques par des antibiotiques. Les biomarqueurs potentiels utilisés sont des enzymes du métabolisme du glutathion, des enzymes antioxydantes et le niveau de peroxydation lipidique. Ces biomarqueurs ont été étudiés sur l'hépatopancréas, les branchies et parfois sur l'hémolymphe.

Les biomarqueurs développés pourront servir à mesurer la réponse au stress des crevettes exposées à des antibiotiques dans les cultures et pourront aider à déterminer les effets d'un contact prolongé avec ces substances.

Des outils protéomiques ont également été utilisés pour étudier le degré d'oxydation des protéines.

2. La crevette tigrée *Penaeus monodon Fabricius* (1798)

2.1 Biologie

2.1.1 Description

La crevette tigrée (*black giant tiger shrimp*) appartient à l'ordre des décapodes (famille des Penaeidés). Comme tous les Penaeidés, celle-ci possède un céphalothorax terminé par un rostre dur, sur lequel on trouve de 2 à 5 dents ventrales et dorsales, caractéristiques de la crevette tigrée. La taille de ce rostre varie avec l'âge : chez les juvéniles, il dépasse le pédoncule anténnulaire, tandis que chez les adultes, il atteint la moitié du second segment anténnulaire.

Le corps de la crevette tigrée est gris à vert, avec des bandes jaunes et noires sur la carapace et des pléiopodes bleu et jaune ⁽¹⁾. La figure 1 montre des représentations de la crevette tigrée.

2.1.2 Cycle de vie

Le frai se déroule toute l'année loin du littoral. Les larves se trouvent donc surtout au large et migrent vers les côtes lors de leur développement, ce qui permet aux juvéniles de se développer dans les estuaires et les marais de mangroves. Les crevettes retournent en mer une fois adultes.

Le développement se déroule en plusieurs étapes :

- six stades nauplii ;
- trois stades protozoé ;
- trois stades mysis ;
- stades mégalope et juvénile (ou « post-larves »).

Les crevettes sont ensuite appelées subadultes jusqu'à la maturité sexuelle (à environ 1,5 ans). Les femelles sont un peu plus grandes que les mâles, avec une taille moyenne de 330 mm à l'âge adulte. Les femelles vivent plus longtemps que les mâles, avec une durée de vie d'environ 2 ans pour les femelles et de 1,5 ans pour les mâles (van de Braak, 2002 ; Groth, 1997 ; FAO (2005).

¹⁾ http://nis.gsmfc.org/nis_fatsheet.php?toc_id=148

2.1.3 Répartition géographique de la crevette tigrée

On trouve la crevette tigrée entre des longitudes de 30° Est à 155° Est et entre les latitudes de 35° Nord et 35° Sud, c'est-à-dire à partir de l'est et du sud-est de l'Afrique et du Pakistan, jusqu'au Japon et Taiwan. La crevette tigrée est également présente dans le nord de l'Australie comme l'illustre la figure ci-dessous.



Figure 2 : Carte de répartition de la crevette tigrée (source : http://nis.gsmfc.org/nis_fatsheet.php?toc_id=148).

2.1.4 Alimentation naturelle

Les crevettes tigrées sont omnivores. Environ 85% de la nourriture ingérée est composée d'algues, de mollusques et de petits poissons et crevettes de toutes espèces. Les individus peuvent également devenir cannibales lorsque la quantité et /ou la qualité de la nourriture disponible diminuent (van de Braak, 2002).

2.2 Culture

2.2.1 Historique

La culture de crevettes a débuté il y a environ un siècle au Sud-Est de l'Asie, quand des crevettes sauvages se sont retrouvées accidentellement dans des étangs destinés à la culture de poissons.

En 2000, sur les 700 000 t de crevettes produites, plus de 85 % provenaient d'Asie (31% de Thaïlande, 12% de Chine, 13% de l'Inde et des Philippines). Les cultures de crevettes n'ont débuté que récemment en Amérique latine et en Afrique.

La crevette tigrée représente 58% de la production mondiale de crevettes et est l'espèce la plus produite en Asie (à l'exception du Japon et de la Chine) (Groth, 1997).

On peut constater sur la *figure 3* que la production mondiale de crevettes tigrées provenant de l'aquaculture a quintuplé entre les années 1980 et 1990 et que la capture mondiale de crevettes tigrées sauvages a pris son essor au début des années 1990.

2.2.2 Principales espèces cultivées

Les trois espèces de crevettes les plus cultivées dans le monde sont : la crevette tigrée, la crevette blanche du Pacifique *Litopenaeus vannamei* Boone (1931) et la crevette chinoise blanche *Fenneropenaeus chinensis* Osbeck (1765).

Environ la moitié de la production totale des fermes consiste en crevettes tigrées.

Une grande majorité des crevettes tigrées produites proviennent de fermes (81 %), tandis que le reste de la récolte est fourni par les pêcheries (Yap, 2003). La crevette tigrée est une espèce très intéressante pour la culture car elle possède un taux de croissance très élevé : les individus atteignent la taille commerciale de 25,3 g en 3,4 mois, de plus, cette espèce tolère une large gamme de salinité. Ceci en fait une crevette très appréciée pour l'élevage.

2.2.3 Différentes méthodes de culture de crevettes au Viêt Nam

Trois grands types de culture existent, avec tous les intermédiaires possibles. Les principales caractéristiques de chaque type de culture sont résumées dans le tableau 1.

- La culture extensive (moins de 25 post-larves par m²) est la plus répandue. Elle se réalise en étangs naturels de 30 à 100 cm de profondeur sur une surface de 0,5 à 1 ha. La densité y est de 300 à 5 000 individus adultes par hectare pour une production de 50 à 500 kg par hectare à chaque récolte (Groth, 1997).
- Les étangs pour la culture intensive ont une profondeur de 120 à 150 cm et une surface de 0,1 à 1 ha. On y trouve 80 000 à 200 000 individus ou plus par hectare pour une production de 5 à 15 t ha⁻¹ récolte⁻¹. L'aération est continue et automatisée, le renouvellement d'eau (30% par jour) se fait par pompage. Les coûts de production sont donc assez élevés (Groth, 1997) (fig. 4).
- Enfin, la culture semi- intensive est un intermédiaire entre les cultures intensive et extensive. Elle se réalise dans des étangs de 1 à 3 ha et de 80 à 150 cm de profondeur. La densité y est de 5000 à 80 000 individus par hectare et la production est de 500 à 5000 kg ha⁻¹ récolte⁻¹. L'échange d'eau se fait par les marées et par pompage, ce qui permet un renouvellement de 5 à 10 % de l'eau par jour. L'aération est occasionnelle, les coûts sont moyens et les rejets d'azote sont modérés (Groth, 1997).

Il existe également les cultures en cages, la polyculture avec des poissons herbivores tels que des carpes et la culture « crevettes- riz » en alternance.

La culture extensive est entièrement dépendante des stocks naturels de larves, même si certains fermiers gardent un stock de géniteurs. Les éclosiers peuvent produire des milliards de post-larves par an (van de Braak, 2002). Malheureusement, les œufs de la crevette tigrée sont souvent de mauvaise qualité et les éleveurs doivent régulièrement faire face à des mortalités massives de larves (Ays *et al*, 2004).

2.2.4 Principales maladies rencontrées dans les cultures de crevettes

Les cultivateurs de crevettes sont souvent confrontés à des mortalités massives dans leurs fermes (chez les larves et/ ou chez les adultes) (Otta, 2001). Par exemple, en Thaïlande, 86% des fermes ont déjà du faire face à des cas de maladies bactériennes ou virales. Ces maladies sont dues à différents agents pathogènes: des bactéries telles que *Vibrio*, la maladie des points blancs (infection virale) ou encore le protozoaire *Zoothamnium* (Holmström *et al.*, 2003).

Il existe d'autres maladies : la « maladie des branchies noires » ou *black gill disease*, qui se développe chez des individus infectés par le champignon *Fusarium incarnatum* (Khoa *et al.*, 2004), la nécrose hématopoïétique virale (Kautsky *et al.*, 2000),...

Les virus peuvent se transmettre par ingestion de tissus provenant d'animaux infectés ou par contact avec de l'eau contaminée (Schuur, 2003).

De nombreuses études ont été réalisées sur le virus de la maladie des points blancs (*white spot syndrome virus*, famille des Nimaviridés), qui est souvent à l'origine de mortalités massives (jusqu'à 100 % de mortalité) dans les fermes les plus touchées (Corsin *et al.*, 2002). Malheureusement, il n'existe actuellement aucun traitement contre ce virus (Witteveldt *et al.*, 2004) ^(A). La maladie des points blancs peut être diagnostiquée par l'apparition de lésions en forme de taches blanches sur la carapace et par la mort rapide des animaux infectés. Les crevettes sont plus sensibles à ce virus quand les températures sont inférieures à 27 °C.

Le « virus de la tête jaune » (*yellow head virus*, YHV, de la famille des Roniviridés) provoque également des pertes significatives dans les cultures de crevettes tigrées en Asie (Kiatpathomchai *et al.*, 2004).

De plus, il existe d'autres facteurs qui augmentent encore le risque de maladies : les animaux sont concentrés, manipulés, ce qui est source de stress (Roch, 1999). Or, une bactérie faiblement virulente telle que *Vibrio* peut causer des infections dans un hôte stressé (Otta, 2001).

2.3 Production et exportation

Au Viêt Nam, la culture de crevettes se situe surtout en région côtière ; et la culture traditionnelle existe depuis longtemps dans les mangroves. En effet, celles-ci présentent des conditions favorables à la croissance de ces organismes. Le delta du Mékong (40 000 km²) est l'endroit le plus productif pour l'aquaculture d'eau saumâtre et pour les pêcheries d'eau douce au Viêt Nam (Le et Munekage, 2004) La figure 5 reprend une carte du delta du Mékong.

Depuis 1986, on constate une augmentation de l'utilisation des mangroves forestières pour la culture de crevettes, car celle-ci s'est développée rapidement au Viêt Nam, faisant de ce pays un des plus grands producteurs de crevettes au monde (Le et Munekage, 2004).

222 000 ha de surface aquatique servaient pour l'aquaculture de crevettes au Viêt Nam en 1991 pour une production de 35 600 t. En 2003, environ 550 000 ha étaient dévolus à la culture de crevettes dans ce pays, dont 460 000 ha dans le Delta du Mékong. La production totale en 2003 était de 200 000 t dont 170 000 t uniquement pour le Delta du Mékong (Kestemont *et al.*, 2005).

Au vu de la grande surface utilisée pour l'aquaculture et des grandes quantités de crevettes produites, il n'est pas surprenant de constater que celles-ci représentent le plus important produit d'exportation au Viêt Nam après le pétrole et les textiles. Environ 13 % des exportations concernent les produits de la pêche. Le secteur aquaculture et pêche contribue à environ 3 % du produit intérieur brut. Le nombre d'exportations vers l'union européenne a chuté fortement dans les années 2000 suite à l'application des normes très strictes de qualité dans ces pays. Par exemple, la tolérance zéro en ce qui concerne la présence de certains résidus d'antibiotiques dans la chair des animaux est d'application.

En 2002, 48% des crevettes du Viêt Nam ont été exportées aux USA ; 36% vers le Japon ; 4 % vers la Chine et 2% vers l'Union Européenne ⁽²⁾.

(2) :

http://64.233.179.104/search?q=cache:Xsz_SIRYjyQJ:143.129.203.3/cas/PDF/CAS43%2520Appendices.pdf+vi+etnam%2Blegislation%2Bshrimp%2Bantibiotic&hl=en&start=22&ie=UTF-8

3. Effets de l'aquaculture sur l'environnement

Pour augmenter la productivité et diminuer les risques de maladies, les fermiers utilisent une grande quantité de substances, avec une moyenne de 13 produits différents (chimiques et biologiques). Les substances les plus utilisées concernent le traitement des sols et de l'eau, des pesticides et des désinfectants, mais plus de 290 produits différents ont été recensés (Gräslund *et al.*, 2003) : vitamines, micro-organismes, immunostimulants, additifs alimentaires et fertilisants. Malheureusement, la plupart du temps, les vendeurs de ces substances ne donnent aux fermiers aucune information concernant le principe actif ni les instructions pour un usage efficace et sans danger. De plus, ceux-ci ne sont pas assez informés sur les différentes maladies et sur le mode d'action des antibiotiques et probiotiques (Holström *et al.*, 2003).

3.1 Les antibiotiques

3.1.1 Utilisation des antibiotiques

Quatre-vingt-six % des fermiers utilisent des antibiotiques à titre préventif. Vingt-sept % des cultivateurs appliquent des antibiotiques comme prophylaxie ou traitement d'infections *virales* telle que la maladie des points blancs (Holström *et al.*, 2003).

Les antibiotiques les plus fréquents sont des quinolones : l'enrofloxacin, la norfloxacin et l'acide oxolinique (Kestemont *et al.*, 2005).

Les antibiotiques en poudre sont mélangés à la nourriture qui est déposée dans l'eau (Hölström *et al.*, 2003). En prévention ou en traitement, il sont distribués plusieurs fois par jour pendant 7 jours environ (Gräslund *et al.*, 2003).

3.1.2 Législation

Lorsque des substances à action thérapeutique sont utilisées en aquaculture, les commerçants doivent porter leur attention sur trois points : les résidus de drogues dans les animaux destinés à la consommation humaine, ensuite le développement de résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes pour l'Homme et enfin les effets toxiques directs via la manipulation de drogues.

Concernant le premier point, l'Union Européenne a interdit certains résidus dans les aliments (tolérance zéro vis-à-vis de ces résidus). Il s'agit de substances pharmacologiquement actives pour lesquelles aucune LMR ne peut être fixée. La LMR est la limite maximale du résidu de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale et un résidu peut être non seulement les principes actifs mais également leurs produits de dégradation et les métabolites qui subsistent dans les parties de l'animal destinées à la consommation (Règlement CEE 2377/90). Le chloramphénicol et les nitrofuranes (dont la furazolidone) sont strictement interdits dans les aliments en Union Européenne. Les antibactériens tels que les quinolones sont considérés comme des contaminants (d'après les règlements 315/93 CE et 466/2001 CE). La quantité maximale autorisée pour les résidus d'enrofloxacin et/ ou de ciprofloxacine sont pour les crustacés de 100 µg kg⁻¹ dans les muscles (Annexe 1 du règlement CEE 2377/90).

En 2001, des résidus de chloramphénicol ont été retrouvés dans des crevettes importées du Viêt Nam.

3.1.3 Quelques alternatives aux antibiotiques

De nombreuses recherches ont été réalisées sur ce sujet car les maladies sont une source importante de perte financière chez les cultivateurs. Ceux-ci utilisent une grande quantité d'antibiotiques, ce qui n'est pas sans conséquence sur l'environnement et sur les organismes vivants (Le et Munekage, 2004).

Voici quelques exemples d'alternatives aux antibiotiques :

- Un certain nombre d'études ont été réalisées sur la vaccination des crevettes mais, malheureusement, il est impossible de vacciner ces animaux pour une longue durée (il existe uniquement une immunité non spécifique chez les invertébrés). Cependant, il est possible de vacciner les crevettes pour une vingtaine de jours (Witteveldt *et al*, 2004 (A). Une injection intra vasculaire de protéines de structure du virus de la maladie des points blancs permet 57 % de survie 25 jours après la vaccination.
- Une autre alternative aux antibiotiques sont les probiotiques. Ceux-ci consistent en micro-organismes non pathogènes (tels que *Bacillus* sp.) qui entrent en compétition avec les bactéries pathogènes pour les nutriments et l'espace (Holström *et al.*, 2003). De plus, *Bacillus* sp. sécrète des antibiotiques naturels auxquels les autres bactéries ne sont pas résistantes (Moriarty, 1998). Plusieurs études ont montré que dans les fermes où *Bacillus* sp. était déversé (directement dans l'eau ou via la nourriture), le taux de survie augmentait, tandis que dans les fermes sans probiotiques, la bactérie luminescente *Vibrio harveyi* avait causé des pertes importantes (Moriarty, 1998 ; Vaseeharan et Ramasamy, 2003).
- En guise de prévention, l'eau peut être traitée à l'ozone: cela désactive les bactéries pathogènes ainsi que les virus et dégrade les composés organiques (Schuur, 2003).

3.2 Effets sur le milieu

3.2.1 Destruction des mangroves

La mangrove est un des écosystèmes les plus productifs de la planète. Elle peut être définie comme l'ensemble des arbres et arbustes tropicaux qui poussent dans la zone intertidale ainsi que la faune particulière associée (crevettes, crabes, mollusques, poissons, oiseaux).

Les mangroves maintiennent une bonne qualité de l'eau des estuaires, jouent un rôle très important dans le cycle de vie de nombreuses espèces commerciales (nursery pour crevettes et poissons marins) et diminuent l'érosion des côtes (Primavera, 2003).

Lors de la mise en place d'une culture de crevettes, une partie de la forêt doit d'abord être détruite. Ensuite, la mangrove restante recevra de la pollution venant de la culture : effluents des étangs, vases dans les eaux côtières, salinisation des sols et de l'eau. Le système doit aussi faire face à l'introduction d'espèces exotiques de crevettes et à de nouvelles maladies (Kautsky *et al*, 2000). L'écosystème des mangroves peut donc être très affecté par une seule ferme.

Les pêcheries de « frai » de crevettes ont un impact sur la biodiversité régionale et sur la structure de la communauté aquatique : lors des pêches, un grand nombre de poissons et de crevettes d'autres espèces sont tuées. De plus, ces captures diminuent la disponibilité en nourriture pour d'autres organismes tels que oiseaux, reptiles,...

Si une grande quantité de déchets organiques provenant de la ferme s'accumulent au fond de l'eau, la décomposition de ceux-ci va consommer beaucoup d'oxygène. Ceci peut conduire à la formation de conditions anaérobies. Ces nutriments favorisent l'eutrophisation de l'eau et l'apparition de « *blooms* » de phytoplancton. La structure de la communauté algale peut également être touchée, par exemple lorsqu'un certain groupe de plancton, notamment des espèces de diatomées, devient dominant (Islam *et al.*, 2004).

3.2.2 Résistance aux antibiotiques et persistance dans les sédiments.

La plupart des antibiotiques finissent dans l'environnement via la nourriture non consommée et les excréments contaminés. De plus, 60 à 85 % des antibiotiques sont excrétés sans changement, c'est-à-dire sous leur forme active. Ceci conduit à l'apparition de résidus chez les organismes non cibles et n'est pas sans danger pour l'environnement et la santé humaine (Le et Munekage, 2004).

Beaucoup de pathogènes de crevettes développent des résistances aux antibiotiques, à cause de l'utilisation de quantités sub-thérapeutiques en tant que moyen prophylactique (Le et Munekage, 2004).

3.3 Cinétiques de contamination et de décontamination chez les crevettes

Différentes études ont été réalisées sur la crevette tigrée et sur d'autres espèces de crevettes. Dans ce type d'expériences, l'administration est soit vasculaire (intra sinusale), soit orale par ingestion forcée ou contamination alimentaire.

Lorsque de l'oxytétracycline (tétracycline) est administrée par ingestion forcée à la crevette tigrée, les temps de résidence dans l'hémolymph, l'hépatopancréas et les muscles dépendent de la dose. A une concentration de 40 mg d'oxytétracycline par kilo, c'est dans l'hémolymph que le temps de résidence est le plus long (10 jours). A des concentrations de 60 et 80 mg d'oxytétracycline par kilo, les plus longs temps de résidence (7 et 14 jours respectivement) sont trouvés dans l'hépatopancréas.

Quelque soit la concentration initiale d'oxytétracycline administrée, la concentration maximale est atteinte après 30 minutes dans l'hémolymph, puis diminue, tandis que dans l'hépatopancréas et les muscles, les concentrations commencent à augmenter 30 minutes après l'administration (Jaiyen *et al.*, 1993).

L'acide oxolinique (quinolone) administré par voie orale pendant 7 jours (2,5 g par kg de nourriture) persiste 14 jours dans l'hépatopancréas et 10 jours dans les muscles de la crevette tigrée (NB : la limite de détection dans cette expérience est de 0,1 ppm) (Somjetlertcharoen *et al.*, 1993).

Les cinétiques d'accumulation et d'élimination de l'acide oxolinique et de l'oxytétracycline ont également été étudiées sur la crevette de Kuruma *Penaeus japonicus* (Bate, 1888) par Uno (2003). Les temps de demi-vie de distribution et d'élimination sont de 0,59 heures et 33,2 heures pour l'acide oxolinique et de 0,45 heures et 24,7 heures pour l'oxytétracycline. Le temps de demi-vie d'élimination est le temps nécessaire pour que la quantité d'antibiotique arrive à la moitié de la quantité de départ.

Un modèle pharmacocinétique de l'oxytétracycline a été réalisé chez la crevette blanche *Litopenaeus setiferus* (Linné, 1767) par Reed *et al.* (2004). L'antibiotique a été donné sous forme de sel par voie intra vasculaire ($11,1 \pm 0,7 \mu\text{g/g}$ de poids corporel).

La variation de la concentration dans l'hémolymph en fonction du temps (voir fig. 6) a été étudiée. Il s'agit d'une équation bi-exponentielle du type : $C = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t}$

où C est la concentration en médicament dans l'hémolymph au temps t ;

A et B sont des constantes (la somme de A et de B représente la concentration extrapolée au temps $t=0$) ;

α est le taux de distribution (constante) ; β est le taux d'élimination (constante) ; t est le temps.

L'équation chez la crevette blanche est : $C = 13,42 \mu\text{g/ml} e^{-0,460/ht} + 3,73 \mu\text{g/ml} e^{-0,036/ht}$. Le temps de demi- vie ($t_{1/2}$) de distribution est de $2,05 \pm 0,48$ heures. Le $t_{1/2}$ d'élimination est de $0,693 / \beta = 22,27 \pm 7,45$ heures. La concentration dans l'hémolymph est de $15 \mu\text{g/ml}$ tout de suite après l'injection et diminue jusque moins de $1,5 \mu\text{g/ml}$ 40 heures après l'injection.

Chez la crevette blanche, le taux de liaison à des protéines dans l'hémolymph est faible : de 20,96 à 14,05% et la majorité de l' oxytétracycline est liée à des protéines de haut poids moléculaire ($>10\,000$).

Vu que peu d' oxytétracycline est sous forme liée, environ 80% de celle-ci dans l'hémolymph est disponible pour traiter une infection. Si la concentration libre est plus grande que la MIC (*minimum inhibitory concentration*) du pathogène, l'infection peut être vaincue. Les MIC de l' oxytétracycline sont connues pour 49 espèces de *Vibrio* et se situent dans des valeurs de concentration de 0,1 à $12,5 \mu\text{g/ml}$

Remarque : pour traiter les infections, les médicaments tels que l'oxytétracycline sont administrés oralement avec la nourriture : très peu d'études pharmacocinétiques ont déjà été réalisées sur ce genre d'administration.

Après injection intra-vasculaire (fig. 7), l'oxytétracycline présente une courte phase de distribution, preuve de la présence d'un profond compartiment périphérique (c'est-à-dire les tissus qui peuvent lier l'antibiotique). Mais ces tissus ne sont pas encore connus.

Le profil est bi-exponentiel : il s'agit d'un profil pharmacocinétique à deux compartiments : une partie de l'organisme dans laquelle le médicament se distribue rapidement et une partie qui se laisse plus difficilement pénétrer par celui-ci (par exemple des organes moins bien irrigués). La concentration en oxytétracycline dans les tissus musculaires est un ordre de grandeur plus petit que les concentrations dans l'hémolymph (de 5 à 10 fois plus petit).

Il existe donc seulement une petite accumulation d' oxytétracycline dans les muscles des crevettes qui sont consommés par les humains.

4. Le stress oxydant

Dans la vie aérobie, des espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*) sont continuellement produites à partir de l'oxygène (O₂) partiellement réduit (Dandapat *et al.*, 2000 ; Hayes *et al.*, 2005). Ce sont des radicaux superoxyde (O₂^{•-}), hydroxyle (OH[•]) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ces substances sont dites « pro- oxydantes » (Dandapat *et al.*, 2000). Un radical libre est un atome ou groupe d'atomes qui possède un électron non apparié. Il peut donc arracher ou donner un électron à une molécule voisine. La durée de vie d'un radical libre peut être très brève (10⁻⁹ secondes pour le radical superoxyde) ⁽³⁾.

Les ROS peuvent réagir avec de nombreuses molécules : elles induisent une peroxydation des lipides et une cassure dans les brins d'ADN. Lorsque ces macromolécules sont oxydées, elles peuvent devenir toxiques et mutagènes (Hayes *et al.*, 2005).

Les ROS provoquent également des modifications sur les protéines, et ce par différents moyens : clivage des protéines, fragmentation des peptides, conversion d'un acide aminé en un autre, modifications oxydantes sur les acides aminés (Talent *et al.*, 1998 ; Conrad *et al.*, 2000).

Tous les acides aminés peuvent s'oxyder, mais les plus sensibles à l'oxydation sont les acides aminés sulfurés (cystéine et méthionine). Les acides aminés liés à des métaux peuvent être également très sensibles à l'oxydation.

Lorsque les cystéines sont oxydées, il se forme des ponts disulfure, des sulfénic- cystéines, des acides cystéine- sulfonique et cystéine- sulfonique qui réagissent avec les résidus cystéines voisins pour former des ponts disulfure.

Les méthionines sont oxydées en méthionines-sulfoxydes (qui peuvent être transformées en méthionines sulfones). Lorsqu'une protéine contient des méthionines-sulfoxydes à la place d'une méthionine, les propriétés physico-chimiques de celle-ci peuvent changer, via une diminution de l'hydrophobicité et de la flexibilité de la protéine.

Malheureusement, dans la plupart des cas, l'oxydation des acides aminés sulfurés est irréversible. En effet, il n'existe que très peu de systèmes enzymatiques qui réduisent les produits d'oxydation des cystéines et méthionines sur les protéines. L'exemple le plus connu est le système glutarédoxine/ glutathion/ glutathion réductase, qui réduit les ponts disulfures et les disulfures mixtes de faible poids moléculaire (tels que ceux contenant du glutathion) (La glutathionylation est un échange de protéines-disulfures entre des groupements sulfhydriles des protéines et le GSSG (glutathion oxydé). Ceci conduit à la formation irréversible d'un disulfure entre le GSSG et la protéine. L'actine (composant du cytosquelette) est fréquemment la cible de la glutathionylation (Mc Donagh *et al.*, 2005)).

Si des acides aminés autres que des méthionines ou cystéines sont oxydés, on constate généralement une formation de groupements hydroxyles et carbonyles (voir point « 3.1.1 » : la carbonylation).

(3) <http://www.univ-orleans.fr/sciences/BIOLOGIE/ressources/TPPV/TPdoc/TPSOD.htm>

En général, les protéines oxydées sont moins thermostables que les formes natives et elles sont moins fonctionnelles que celles-ci. Les protéines oxydées peuvent donc être dégradées par le protéasome (de manière dépendante de l'ATP ou de l'ubiquitine) (Mary *et al.*, 2004).

En temps normal, il existe un équilibre entre les taux de production et de destruction des ROS. Celles-ci sont neutralisées par le système anti-oxydant (enzymes et molécules de faible poids moléculaire) (Dandapat *et al.*, 2000). Si cet équilibre est altéré en faveur du système pro-oxydant, l'organisme doit faire face à un stress oxydant. Ceci conduit à la détérioration de la membrane plasmique des cellules et à une peroxydation lipidique avec formation d'aldéhydes tels que les « substances réactives à l'acide thiobarbiturique » (TBARS) dont le malondialdéhyde (MDA). La peroxydation lipidique est d'ailleurs souvent utilisée comme biomarqueur de stress oxydant (Mourente *et al.*, 1999).

Les sources des stress oxydant sont nombreuses : une exposition aux pesticides, aux métaux lourds, certaines lésions, l'hypoxie, une alimentation non équilibrée,... (Dandapat *et al.*, 2000).

En conditions normales, les antioxydants enzymatiques (telles que la superoxyde dismutase et la catalase) et non-enzymatiques (glutathion (GSH)) existent à une concentration basale, suffisante pour protéger l'organisme contre la production de radicaux libres. En cas de stress, l'activité de ces enzymes peut augmenter fortement. Les enzymes antioxydantes peuvent donc être considérées comme des enzymes de stress, de même que les « Heat Shock Proteins » (HSP) (Le Bourg, 2001). Les principaux mécanismes du stress oxydant sont résumés figure 8.

4.1.1 La carbonylation

La carbonylation est une modification irréversible des acides aminés (en particulier les lysines et arginines) en groupements aldéhyde ou cétone (Ghezzi *et al.*, 2003 ; Mc Donagh *et al.*, 2005). Les groupements carbonyles peuvent être introduits dans la protéine à différents sites et par différents mécanismes. Par exemple, le « squelette » de la protéine peut être directement oxydé, ce qui conduit à la formation de fragments protéiniques. Les acides aminés de la chaîne latérale (en particulier les histidines, arginines et lysines) peuvent être oxydés en cétones ou en dérivés aldéhydes.

La carbonylation peut également résulter d'une réaction avec les produits de la peroxydation lipidique ou encore par conjugaison soit avec des sucres réducteurs (glycation) soit avec les produits d'oxydation de ces sucres (glycoxydation) (Ghezzi *et al.*, 2003).

La carbonylation des protéines peut conduire à l'agrégation de celles-ci, ainsi qu'à leur inactivation et dégradation (Mc Donagh *et al.*, 2005). Il existe d'ailleurs une corrélation assez élevée entre le nombre de groupements carbonyles au sein d'une protéine et l'importance des dommages causés par le stress oxydant sur cette même protéine (Conrad *et al.*, 2001).

Les groupements carbonyles peuvent réagir avec le 2,4 dinitrophénylhydrazine (DNPH) pour former une hydrazone liée à une protéine. Cette hydrazone peut être décelée par une réaction immunospécifique (Talent *et al.*, 1998).

4.1.2 Stress oxydant chez les crustacés

Chez les crustacés, peu d'études ont été réalisées sur les enzymes antioxydantes. Cependant, leur importance chez les invertébrés pourrait être plus élevée que chez les vertébrés. En effet, les invertébrés ne possèdent pas de système immunitaire spécifique et la lutte contre les micro-organismes se réalise essentiellement via la phagocytose. Or, la phagocytose serait associée à la production d'espèces réactives de l'oxygène (Tavarez- Sánchez *et al.*, 2004).

Chez la crevette géante d'eau douce *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879), Dandapat *et al* (2000) ont montré que les branchies sont moins sujettes au stress oxydant que l'hépatopancréas : le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) des branchies diffuse vers l'eau environnante et sa concentration est diminuée. Comme la catalase n'est pas très efficace à de faibles concentrations d' H_2O_2 , son activité est moins élevée dans les branchies que dans l'hépatopancréas. La quantité plus importante de peroxyde d'hydrogène dans l'hépatopancréas a également un effet positif sur la régulation de l'expression de la glutathione peroxydase (Dandapat *et al.*, 2000).

4.1.3 Exemple de stress oxydant suite à une contamination par des polluants

Une étude réalisée par Mc Donagh *et al.* (2005) compare des moules communes *Mytilus edulis* (Linné, 1758) récoltées dans un milieu pollué avec des individus provenant d'un site de référence. En général, les signatures d'expression protéiques (SEPs) étaient semblables dans les branchies et la glande digestive des contrôles comme des organismes vivant en milieu pollué, à l'exception d'un spot de protéines surexprimé dans les branchies des animaux du site pollué. Cependant, la carbonylation des protéines était plus importante chez les individus du site pollué. Le niveau de protéines glutathionylées était plus important dans les branchies que dans la glande digestive et cette différence était plus prononcée chez les individus récoltés dans un milieu pollué que chez les individus contrôles.

4.2 Les biomarqueurs

4.2.1 Définitions

Un biomarqueur est défini comme un changement observable et/ ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental. Il donne des informations sur l'exposition de l'individu à au moins une substance à caractère polluant, et ce à un moment quelconque de la vie de l'individu (Pellerin, 2005 ^(A)).

Cajaraville *et al* (2000) définissent un biomarqueur comme « un indicateur à court terme d'effets biologiques à long terme ». Les biomarqueurs de polluants divers (tels que des antibiotiques) peuvent être des protéines de stress et des enzymes de stress oxydant. Le glycogène et autres polysaccharides indiquent également la présence de polluants (Pellerin, 2005 ^(A)).

Les biomarqueurs ont une grande importance en écologie car une simple analyse chimique des échantillons ne donne aucune information sur les effets néfastes des polluants dans le biotope (Cajaraville *et al.*, 2000). L'état de santé des individus ainsi que la qualité du milieu peuvent être évalués par dosage de biomarqueurs (Pellerin, 2005 ^(A)).

Si des biomarqueurs dosés sur un organisme indiquent une présence de polluants dans le milieu, il est probable que les autres individus de cette espèce soient également touchés, ce qui à long terme pourrait avoir un effet sur la survie et la reproduction de cette espèce.

Les biomarqueurs cellulaires et moléculaires peuvent donc anticiper les changements à des niveaux d'organisation plus élevés, tels que la population, la communauté et l'écosystème. Cette approche permet d'appréhender les problèmes et changements de l'environnement avant qu'ils ne deviennent irréversibles (Cajaraville *et al*, 2000).

4.2.2 Les biomarqueurs d'effet ou d'exposition

Les biomarqueurs d'exposition renseignent sur l'exposition présente ou passée à un polluant. Exemple : des monooxygénases du cytochrome P 450 telles que l'EROD (7-ethoxy resorufin-O-deethylase).

Les biomarqueurs d'effet servent à évaluer les effets des xénobiotiques sur les individus, les populations ou l'écosystème et nous renseignent sur le statut physiologique des organismes. Exemple : l'acétylcholine estérase est un biomarqueur d'effet utilisé par exemple suite à l'exposition aux pesticides organophosphorés et carbamates (qui l'inhibent en se liant au site actif de l'enzyme) (Pellerin, 2005 ^(B)).

4.3 Biomarqueurs enzymatiques

4.3.1 Introduction

La fonction des enzymes antioxydantes est de contribuer à la disparition des intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROI) afin de protéger l'organisme contre le stress oxydant (Cajaraville *et al.*, 2000). Les enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase et la catalase sont des biomarqueurs potentiels de pollution. Elles ont déjà été utilisées comme tels dans des programmes de *biomonitoring* en Méditerranée (Péninsule Ibérique). Leur activité peut augmenter lorsque l'organisme est confronté à une pollution (Cajaraville *et al.*, 2000).

La concentration en antioxydants dans un tissu ou une cellule donnée varie en fonction de multiples facteurs tels que le stade de développement des individus. Les activités de la catalase, superoxyde dismutase et de la glutathion réductase sont différentes d'une espèce à l'autre (chez les mollusques, crustacés et poissons) (Rudneva *et al.*, 1999).

4.3.2 Les différents biomarqueurs moléculaires

4.3.2.1 Métabolisme du glutathion

Les grands principes du métabolisme du glutathion sont résumés à la figure 9.

La **glutathion peroxydase** (GPx) est très importante dans la prévention de l'initiation des radicaux libres dans les membranes. Elle est formée de deux iso-enzymes : la GPx Se-dépendante, dont les substrats sont le peroxyde d'hydrogène et d'autres peroxydes (organiques), et la GPx « non-Se-dépendante », qui sert uniquement à la disparition des peroxydes organiques (Arun *et al.*, 1998). La GPx réduit l'H₂O₂ en oxydant le glutathion suivant cette équation :



La GPx a été localisée par des techniques immunologiques dans les cellules sanguines du crabe vert *Carcinus maenas* (Linné) (Orbéa *et al.*, 2000).

La **glutathion réductase** (GR) catalyse la formation de glutathion réduit (GSH) à partir de glutathion oxydé GSSG et de NADPH :



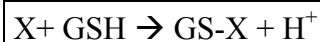
La GR est présente dans l'hépatopancréas et les branchies de la crevette géante d'eau douce à des concentrations très faibles (de l'ordre du nanomolaire) (Dandapat *et al.*, 2000).

La **glucose 6 phosphate déshydrogénase** (G6PDH) régénère le NADP⁺ formé par la GR en NADPH via la première étape de la voie des pentoses phosphates (Ru5P= ribulose 5 phosphate). Les enzymes de la voie des pentoses phosphates sont surtout présentes dans le cytosol des cellules hépatiques et dans les cellules du tissu adipeux. La réaction suivante est irréversible et la G6PDH est inhibée par le NADPH produit (Garrett et Grisham, 2000).



La **glutathion-S-transférase** (GST) est une famille d'enzymes qui se retrouve dans le cytosol et les mitochondries (GST soluble) et dans les microsomes (GST associées aux membranes) (Hayes et al, 2005). La GST catalyse une réaction de conjugaison (attaque nucléophile) entre le glutathion et des molécules réactives contenant des sites électrophiles (carbone, azote ou atome de soufre). Elle détoxifie les xénobiotiques électrophiles (polluants, médicaments, antibiotiques, pesticides tels que DDT,...) en inactivant les aldéhydes endogènes α , β insaturés, les quinones, les époxydes et hydroperoxydes (métabolites secondaires fournis lors du stress oxydatif) (Hayes *et al*, 2005). La GST rend ces substances moins toxiques et plus hydrosolubles que les molécules de départ ⁽⁴⁾.

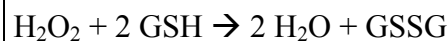
Cette enzyme est également impliquée dans certains transports et biosynthèses intracellulaire (synthèse de leucotriènes, prostaglandines) (Hayes *et al*, 2005).



Réaction de conjugaison du GSH avec un composé électrophile (X), catalysée par la GST (voir fig. 10).

Ajoutons aux enzymes du métabolisme du glutathion, le glutathion lui-même.

Le **glutathion total** (GSH+ GSSG) est un thiol non protéinique. Il aide à la disparition de l' H_2O_2 dans la cellule : deux molécules de glutathion réduisent une molécule d' H_2O_2 pour donner deux molécules d'eau et une molécule de glutathion oxydé.



Le glutathion total est donc essentiel pour l'intégrité structurale et métabolique de la cellule (Dandapat *et al*, 2000).

Le rapport GSH/ GSSG est fréquemment utilisé pour déterminer la statut redox de la cellule. En effet, ce rapport augmente quand le GSSG est lié aux protéines (c'est-à-dire quand le taux de glutathionylation est élevé) (Fratelli *et al.*, 2001).

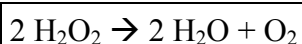
(4) <http://www.chez.com/biomar/ecotox08.html>

4.3.2.2

Autres biomarqueurs

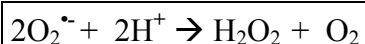
La catalase, la superoxyde dismutase (SOD) (et la GPx) constituent un des premiers et plus importants mécanismes de défense contre l'oxydation. La catalase et la GPx détoxifient le peroxyde d'hydrogène résultant de l'activité de la SOD (Mourente *et al.*, 1999). Les activités de la catalase et/ ou de la GPx s'accroissent normalement fortement quand la SOD augmente, ceci afin d'empêcher l'accumulation trop importante de peroxyde d'hydrogène.

Chez la crevette blanche du Pacifique, la **catalase** est une hémoprotéine formée de quatre sous-unités identiques d'environ 57,26 KDa chacune. Cette enzyme réduit deux molécules de peroxyde d'hydrogène en deux molécules d'eau et une molécule d'oxygène :



La catalase est une protéine très conservée : elle est présente depuis les procaryotes jusqu'aux mammifères. Elle est également l'enzyme la plus abondante du peroxysome (Orbéa *et al.*, 2002). Chez les crustacés, les taux d'ARN messenger pour la catalase sont plus élevés dans l'hépatopancréas que dans les branchies et sont non détectables dans les muscles (Tavares-Sánchez *et al.*, 2004).

La **superoxyde dismutase** (SOD) catalyse la réaction de dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène :



La superoxyde dismutase manganèse dépendante (Mn-SOD) est mitochondriale, tandis que la Cu-Zn SOD se trouve dans le cytosol. Cependant, celle-ci peut également se trouver dans les noyaux, lysosomes, mitochondries et peroxysomes des hépatocytes de poisson. Chez les crabes verts, la SOD est trouvée uniquement sous forme monomérique (17 KDa pour la Cu, Zn SOD et 25 KDa pour la Mn SOD (Orbea *et al.*, 2000)).

L'activité de la superoxyde dismutase est moins élevée dans les muscles de la crevette d'eau douce de mousson *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne-Edwards, 1844) que dans les branchies, car de l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ est formé dans celles-ci pendant la respiration (Arun *et al.*, 1998).

En conditions normales, le métabolisme oxydatif est plus élevé dans l'hépatopancréas de la crevette géante d'eau douce que dans les autres tissus (tels que branchies et muscles), ce qui conduit à la formation d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ et de peroxyde d'hydrogène. Les activités de la glutathion peroxydase, de la superoxyde dismutase, de la catalase et de la glutathion-S-transférase sont donc plus élevées dans l'hépatopancréas que dans les branchies (Dandapat *et al.*, 2000).

L'**acétylcholine estérase** (Ach-E) hydrolyse l'acétylcholine en choline et acide acétique. Cette enzyme intervient également dans les processus de détoxification, par exemple suite à l'exposition aux pesticides organophosphorés et carbamates (qui l'inhibent en se liant de façon réversible ou non au site actif de l'enzyme). L'activité de l'acétylcholine estérase dans le sang et différents tissus commence à être utilisée comme indicateur d'exposition à des substances telles que carbamates et pesticides organophosphorés (Pellerin, 2005 (B)).

La **7-ethoxyresorufin-O-deethylase** (EROD) est une monooxygénase du cytochrome P 450. Elle permet de détecter les réponses biologiques à une accumulation de xénobiotiques organiques tels que les hydrocarbures polyaromatiques (PAH) et les poly-chloro-biphényles (PCBs). Cette enzyme est très souvent utilisée comme biomarqueur d'exposition. Cependant, si l'individu est exposé à une pollution très intense, l'activité du cytochrome P 450 peut diminuer fortement. L'EROD, comme tous les biomarqueurs d'exposition, devrait être utilisée en association avec des biomarqueurs de stress afin de définir l'état de santé général de l'individu (Cajaraville et al., 2000).

Les **Heat Shock Proteins** (HSP) : certaines HSP sont des chaperonnes qui empêchent la dénaturation des protéines en maintenant leur structure et qui aident au repliement des protéines dénaturées (exemple : HSP 70) ⁽⁵⁾

⁽⁵⁾ <http://www.theantiagingdoctor.com/39/stresschap.htm>

La peroxydation lipidique.

Voici un résumé des principaux événements qui se produisent lors de l'oxydation des lipides. La première étape est appelée « initiation » : un hydrogène $H\bullet$ est arraché à un lipide LH (lipide contenant un acide gras polyinsaturé par exemple) par une substance pro-oxydante telle que les ROS. Le diène conjugué $L\bullet$ qui en résulte est assez instable et donc s'oxyde facilement pour donner un radical peroxyde $LOO\bullet$. Ce radical est très réactif et peut à son tour arracher des $H\bullet$ à d'autres lipides (étape nommée « propagation »). Les hydroperoxydes lipidiques ainsi formés ($LOOH$) peuvent être à nouveau peroxydés. Ces radicaux sont nocifs pour l'organisme.

Les radicaux peroxydes peuvent donner un radical endoperoxyde par cyclisation interne. Le malondialdéhyde (MDA) est le résultat de la fragmentation des lipides contenus dans cet endoperoxyde (Raes, 2005). La figure suivante illustre de façon simplifiée les grandes étapes de la peroxydation lipidique.

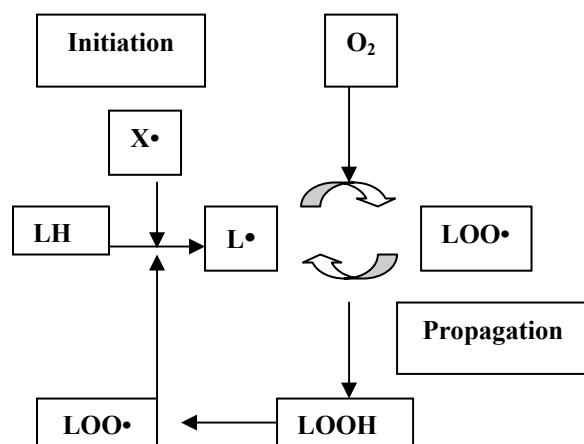


Figure 11 : Schéma simplifié de la peroxydation lipidique :

$X\bullet$: radical réactif susceptible d'arracher un atome d'hydrogène au lipide ; LH : lipide contenant un acide gras polyinsaturé ; $L\bullet$: radical lipidique ; $LOO\bullet$: peroxyde lipidique ; $LOOH$: hydroperoxyde lipidique.

4.3.3 Exemple d'activités des biomarqueurs enzymatiques et autres chez différentes espèces de crevettes.

Le tableau sur la page de gauche reprend différents résultats de dosages sur d'autres espèces de crevettes. Ils permettent de donner une idée des gammes de concentration de ces biomarqueurs. Cependant il est difficile de comparer ces valeurs entre elles, car les conditions expérimentales sont différentes ainsi que les organes étudiés et les unités utilisées. Les activités enzymatiques trouvées chez les différentes espèces de crevettes sont en général assez faibles, de l'ordre du nanomolaire ou du micromolaire dans le cas de la catalase.

5. Synthèse de l'introduction

L'aquaculture de crevettes occupe une place importante dans l'économie du Viêt Nam. Une espèce très prisée pour la culture est la crevette tigrée *Penaeus monodon*, notamment en raison de son taux de croissance particulièrement élevé. Malheureusement, les crevettes sont souvent sujettes à des infections bactériennes ou virales telles que la maladie des points blancs, qui peuvent parfois provoquer jusqu'à 100% de mortalité dans les fermes les plus touchées, rendant invendable toute une récolte, ce qui est source de perte financière chez les cultivateurs.

Pour éviter ces problèmes, les fermiers utilisent de nombreuses substances, sans toutefois connaître leur fonctionnement ni les effets de ces substances, tant sur la santé humaine et animale que sur l'environnement naturel. Les antibiotiques sont fréquemment utilisés, parfois même lorsque les crevettes sont infectées par des virus ! Les crevettes destinées à l'exportation peuvent ainsi contenir des résidus d'antibiotiques dans leur chair, parfois même des antibiotiques strictement interdits tels que la furazolidone. Ceci pose évidemment problème lors des exportations.

De plus, très peu d'études ont été réalisées à ce jour sur l'impact des antibiotiques sur la santé des crevettes elles-mêmes ainsi que sur le devenir des résidus d'antibiotiques dans la chair de ces animaux. En particulier, les antibiotiques pourraient être une source de stress oxydant chez les individus contaminés, ce qui pourrait influencer les taux de production dans les fermes. Ce stress éventuel serait dû à la détoxification des antibiotiques dans l'organisme, qui crée notamment des espèces réactives de l'oxygène ou ROS. Celles-ci peuvent réagir avec de nombreuses molécules biologiques : l'ADN, les protéines et les lipides, ces derniers pouvant être peroxydés. Une des modifications des protéines est la carbonylation, qui se produit lorsque des acides aminés sont modifiés de façon irréversible en groupements aldéhyde ou cétone. Les protéines carbonylées peuvent perdre leur fonction et être dégradées.

Différents biomarqueurs de stress oxydant existent. Ils peuvent être utiles lors d'études sur l'effet de la pollution sur les organismes qui vivent dans un milieu contaminé par différentes substances. Mais peu d'études utilisent à ce jour de tels biomarqueurs dans le cadre d'exposition d'organismes aquatiques à des antibiotiques.

6. Objectifs du mémoire

L'objectif général de ce mémoire est d'obtenir une vision globale de l'état de stress oxydant chez la crevette tigrée suite à une exposition dans la nourriture à des antibiotiques de la famille des quinolones et des nitrofuranes. D'éventuelles modifications d'activités d'enzymes antioxydantes ou d'autres indicateurs de stress oxydant pourront ensuite être mesurés sur des individus sauvages et d'élevage. Ceci permettra de déterminer une contamination éventuelle des individus par ces antibiotiques ainsi que les réponses physiologiques induites par ces substances et ce sans qu'il ne soit nécessaire de doser les résidus d'antibiotiques dans les tissus, technique peu applicable dans les pays producteurs de crevettes tels qu el Viêt Nam.

Pour ce faire, différentes molécules impliquées dans la réponse au stress oxydant (enzymes et molécules non enzymatiques) ont été dosées. En première approche, des techniques d'analyse protéomique ont également été testées afin de détecter des protéines carbonylées.

Les moyens mis en œuvre :

Des crevettes ont été exposées séparément à deux antibiotiques. Les échantillons ont été récoltés à différents moments (pendant les contaminations et après l'arrêt de celles-ci).

Les différents biomarqueurs ont été évalués dans l'hépatopancréas, les branchies et l'hémolymph.

La concentration en antibiotiques réellement présente dans les organismes a été dosée dans les muscles à l'Université de Liège.

II Matériel et méthodes

1 Les animaux

Les crevettes (poids moyen individuel : 10g) proviennent d'une ferme d'élevage intensif située à Ca Mau, au sud-ouest du delta du Mékong, Viêt Nam (fig. 1).

Elles ont été réparties dans 9 bassins de 2 m³ chacun : 70 individus dans chaque bassin « test » (3 bassins par antibiotique) et 30 individus dans chaque bassin « contrôle ». Les bassins ont été placés dans le laboratoire dans des conditions de photopériode naturelle (12 heures de jour et 12 heures de nuit) sous aération constante (fig. 2). L'eau (eau de mer, salinité de 25 g l⁻¹) était à température ambiante, c'est-à-dire environ 30 à 31.

2 Expositions

Après acclimatation dans leur environnement expérimental durant 14 jours, les crevettes ont été nourries à environ 4% du poids moyen par jour (quantité adaptée chaque jour en fonction de l'appétit des crevettes, distribuée en 4 repas, à savoir à 8, 11, 14 et 17 h). Pendant 7 jours, elles ont reçu de la nourriture (40% de protéines brutes) mélangée aux antibiotiques (phase de contamination), ensuite elles ont été nourries sans antibiotique pendant 7 jours (phase de décontamination) (fig. 3). La nourriture contaminée non mangée a été retirée régulièrement des bassins.

Deux types d'antibiotiques (nitrofurane- furazolidone et quinolone- enrofloxacin, voir ci-dessous) ont été mélangés par pulvérisation à la nourriture commerciale et fixés avec de l'huile de foie de calmar. L'enrofloxacin est une quinolone de plus en plus fréquemment utilisée dans les fermes de crevettes en Asie, malgré son coût élevé, alors que la furazolidone est un agent anti-microbien à large spectre, également utilisé de manière très fréquente dans les élevages de crevettes en Asie avant son interdiction dans la plupart des pays car considéré comme un carcinogène potentiel (FAO, 2005). La nourriture a été conservée à -80 °C. Les contrôles ont reçu de la nourriture sans antibiotique.

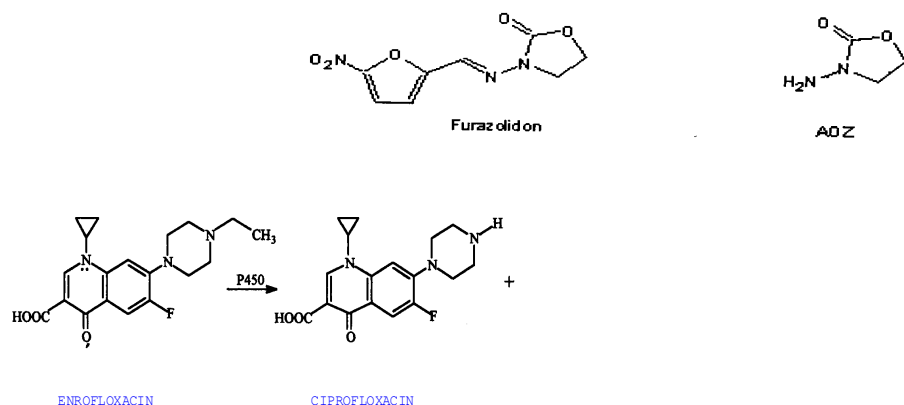


Figure 4 : En haut : formule chimique de la furazolidone et d'un de ses dérivés, la 3-amino-2-oxazolidone (AOZ). En bas : formule chimique de l'enrofloxacin et d'un de ses métabolites, la ciprofloxacin, après transformation par le cytochrome P450

3 Échantillonnage

Les échantillons des crevettes «test» ont été récoltés à 0 h, 96 h et 171 heures après le début des contaminations et à 24 h et 7 jours après l'arrêt de celles-ci. Les crevettes «contrôles» ont été échantillonnées à 0 et 171 heures après le début des contaminations et 7 jours après l'arrêt de celles-ci. Un schéma de l'expérience est représenté à la figure 5. A chaque échantillonnage, 4 crevettes par bassin ont été tuées par décapitation. L'hémolymph a été prélevée dans les vaisseaux ventraux et / ou dorsaux et mélangée à de l'anticoagulant (citrate de sodium 1%) (environ 0,3 ml d'anticoagulant par ml d'hémolymph). L'hépatopancréas, les branchies et les muscles ont été rapidement enlevés et homogénéisés dans du tampon phosphate 50 mM (pH 7,5) contenant des inhibiteurs de protéases (Sigma P2714 (1 :5 w/v)). La composition des inhibiteurs de protéases est la suivante : AEBSF 2 mM, EDTA 1 mM, bestatine 130 μ M, E-64 :14 μ M, leupeptine 1 μ M et aprotinine 0,3 μ M. Un volume de 500 μ l de chaque homogénat a été conservé pour les dosages de la LPO. Les homogénats pour les autres biomarqueurs ont ensuite été centrifugés pendant 10 min à 1000 X g à 4 °C et les surnageants ont été conservés à -80°C (fig. 6 et 7).

4 Dosages des biomarqueurs

Les biomarqueurs suivants ont été analysés : la glutathion réductase, la glutathion-S-transférase, la glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase totale, la glucose-6-phosphate déshydrogénase, la catalase, le glutathion total et enfin le degré de peroxydation lipidique.

Les principes généraux de dosage sont décrits ci-dessous. Les protocoles détaillés sont décrits en annexe. La plupart des dosages ont été réalisés au laboratoire du Collège d'aquaculture et pêcheries, C  n Tho, Viêt Nam.

L'activité de la **glutathion réductase** (GR) a été dos  e en mesurant l'oxydation du NADPH à 340 nm (coefficient d'extinction : 6,22 μ M⁻¹ cm⁻¹) en présence de GSSG 1mM, de NADPH 0,1mM et de tampon phosphate 100 mM pH 7,6+ EDTA 0,5 mM (d'après une technique décrite par Carl  dberg et Mannervik (1975) et modifi  e par Mohandas *et al.* (1984)).

L'activité de la **glutathion-S-transférase** (GST) a été mesur  e en suivant la formation de Glutathion-CDNB à 40 nm (coefficient d'extinction : 9,6 mM⁻¹ cm⁻¹) en présence de GSH, de CDNB 0,7 mM et de tampon h  p  s 33mM pH 7,5 (d'après Habig *et al.*, 1974)).

L'activité de la **glutathion peroxydase** (GPX) a été d  termin  e en suivant le taux d'oxydation du NADPH à 340 nm (coefficient d'extinction : 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹) par une réaction coupl  e à la glutathion- réductase, et ce en présence de GSH 1mM, de NADPH 0,2 mM, de GR (1 U/ml), d' H₂O₂ 0,25mM et de tampon phosphate 50mM pH 7 + EDTA 1mM + NaN₃ 1mM (d'après la technique décrite par Flohé et G  nzler (1984) et modifi  e par Mohandas *et al.* (1984)).

L'activité de la **superoxyde dismutase totale** (SOD) a été déterminée en mesurant l'inhibition de la formation de NBT diformazan (absorbance 560 nm) en présence de xanthine oxydase (0,5 U/ml), de tampon phosphate 50 mM pH 7,8 + DTPA 1,33mM + BSA 0,2 g/ ml et d'un « mix ». La composition de ce mix est la suivante : NBT 2,24 mM, xanthine 1,8 mM, catalase 40 U/ml, BCS 10 mM ('après la technique décrite par Mockett *et al.*, 2002)

Une unité enzymatique de SOD correspond à la quantité d'échantillon qui induit une inhibition de 50 % de la réduction du NBT. Une unité de SOD transforme une μ mole de substrat par min. ⁽¹⁾

L'activité de la **glucose-6-phosphate déshydrogénase** (G6PDH) a été mesurée en suivant la formation de NADPH (absorbance 340 nm ; coefficient d'extinction= $6,22 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), en présence de glucose-6-phosphate 1,33 mM et de tampon tris-KCl 70 mM pH 7,8 + MgCl_2 7 mM + NADP 0,14 mM (d'après la technique décrite par Glock et McLean (1953)).

L'activité de la **catalase** a été mesurée en suivant la diminution du peroxyde d'hydrogène à 240nm (coefficient d'extinction= $0,04 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$), en présence de TiOSO_4 (1,7g dans 500 ml H_2SO_4 2N), de H_2O_2 30% et de tween 0,04 mM (technique adaptée d'après Baudhuin *et al.*, 1964).

Le **glutathion total** (GSH+ GSSG) a été dosé en suivant la réaction du GSH avec le DTNB (absorbance 412 nm) en présence de DTNB 0,2mM, d'EDTA 0,1 mM, de SSA 5% et de tampon phosphate KH_2PO_4 200 mM pH 7,5 + EDTA 0,1 mM. Le GSSG (glutathion oxydé) est réduit par la GR(0,5 U/ ml) en présence de NADPH 0,2mM.

De plus, le niveau de **peroxydation lipidique** (absorbance 535 nm) a été analysé en présence de TCA 5%, de DMSO, d'éthanol, de 1, 1, 2,3 méthylmalonalaldéhyde (TMOP) 500 μM et de TBA 0,67% (d'après Fatima *et al.*, 2000).

Enfin, les **protéines** ont été dosées par la méthode colorimétrique de Lowry en présence de KH_2PO_4 , de CuSO_4 1%, de tartrate de sodium 2%, de Na_2CO_3 2%, de NaOH 1N et du réactif de Folin. Les résultats des dosages peuvent donc être rapportés par mg de protéines (activité spécifique).

Les données relatives aux différents dosages ont été traitées via un logiciel Microsoft Excel.

(1) <http://www.univ.orleans.fr/sciences/BIOLOGIE/ressources/TPPV/TPdoc/TPSOD.htm>

5 Détermination des protéines carbonylées en analyse protéomique

Trois essais de mise au point ont été réalisés. Le protocole varie pour quelques points. La technique utilisée ainsi que les changements apportés à chaque essais sont repris dans ce chapitre.

5.1 Préparation des échantillons :

Les échantillons (hépatopancréas de crevettes tigrées) sont homogénéisés par sonication (2 fois 15 secondes sur glace) dans du tampon de lyse dont nous avons fait varier la composition (voir tableau 1).

Pour l'essai 1, les échantillons ont été homogénéisés dans le premier tampon de lyse dont la composition est indiquée dans le tableau suivant.

Tableau 1 : Compositions des différents tampons de lyse utilisés lors des essais d'analyse en protéomique.

	Tampon 1	Tampon 2	Tampon 3
Urée	7 M	7 M	7 M
Thiourée	2 M	2 M	2 M
Chaps	0,5%	0,5%	2 %
DTT	10 mM	10 mM	1 %
SB 3-10	/	/	2 %
Inhibiteur de protéases	Non	Oui	Oui
IPG 3-10 NL	1%	1 %	0,5%

Les échantillons pour l'essai 2 ont été homogénéisés dans le même tampon + des inhibiteurs de protéases (Sigma P2714 (1 :5 w/v)). La composition des inhibiteurs de protéases est la suivante: AEBSF 2 mM, EDTA 1 mM, bestatine 130 μ M, E-64 14 μ M, leupeptine 1 μ M et aprotinine 0,3 μ M. Ensuite, le traitement « *clean-up* » (précipitation des protéines, protocole détaillée en annexe) a été appliqué sans centrifugation préalable.

Les échantillons de l'essai 3 ont été homogénéisés dans le tampon 3. Ils ont ensuite été centrifugés 15 min à 12000g avant d'être nettoyés grâce au kit « *clean-up* » de Amersham.

Pour les 3 essais, les échantillons ont tous été centrifugés 5 minutes à 10 000 (?) X g juste avant d'être placés dans les strips afin d'éviter la présence trop importante de sels dans l'échantillon..

Les protéines ont été dosées par la méthode Bradford.

Les strips (11 cm, pH 3-11 non linéaire (NL)) ont été réhydratés toute une nuit dans la solution DeStreak + IPG (5 μ l/ ml) (200 μ l/strip).

.

5.2 Première dimension (IEF= iso-electric focusing)

Les paramètres de la première dimension, réalisée sur un IPGphor (Amersham), sont les suivants :

- 1h à 500 V (*step and hold*)
- 1h à 1000 V (gradient)
- 2h à 6000 V (gradient)
- 6000 V pour 3000 V/h (*step and hold*).

5.2 Dérivatisation

Le principe de la dérivatisation est le suivant : le DNPH réagit avec les groupes carbonyles des protéines. Ceci conduit à la formation d'une hydrazone liée à une protéine. La portion DNP de l'hydrazone sera ensuite reconnue par un anticorps (dans les étapes suivantes).

Un marquage au DNPH a d'abord été réalisé avec une solution de TFA 10% + DNPH 10 mM pour les essais 1 et 2 ou une solution de HCl 2 N/ DNPH 10 mM (essai 3) pendant 20 min suivies de 15 min de rinçage (et neutralisation) dans une solution de Tris- base 2M/ glycérol 30%.

L'étape suivante est l'équilibration, qui a été réalisée dans du tampon d'équilibration (TE) : Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, urée 6 M (Plus One), glycérol 30%, SDS 2%: 15 min dans TE+ DTT (100 mg DTT/ 10 ml TE) + 70 µl bleu de bromophénol (BB) / 10 ml TE et ensuite 15 min dans TE+ iodoacétamide (350 mg iodoacétamide/ 10 ml TE)+ 70 µl BB/ 10 ml TE.

5.3 Deuxième dimension (SDS-PAGE)

La migration a été réalisée pendant toute une nuit à 1 W/ gel dans un gel de polyacrylamide (acryl/ bis 12,5 % ; Tris-HCl 0,375 M pH 8,8 ; APS 0,1% ; TEMED 0,0139 % ; SDS 0,1%). Cette migration a été réalisée dans du tampon d'électrophorèse dont la composition était la suivante : (les concentrations sont données pour une solution stock à diluer 10 fois) Tris 151,2g + glycine 720 g+ SDS 50g + H₂O distillée → 5 litres.

5.4 Western-Blot

Les gels et les membranes ont été équilibrés pendant 20 minutes avant le *western-blot* dans du tampon de transfert (Tris 48 Mm ; glycine 39 mM ; méthanol analytique 20 % ; SDS 0,0375%). La durée du *western blot* était de 45 min pour l'essai 1 ; 1 heure pour l'essai 2 et 2 heures à 15 V pour l'essai 3). Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose de porosité 0,45µm (Perkin Elmer).

La coloration par Blot FastStain de toutes les protéines transférées sur la membrane de nitrocellulose a ensuite été réalisée en présence de fixateur (2 à 3 min) et ensuite de développeur (30 min dans le noir à 4°C). La décoloration a été réalisée en lavant la membrane dans de l'eau à 40-45°C pendant environ 30 minutes (jusqu'à la disparition des spots) à la lumière puis lavée 2 fois 10 minutes dans de l'eau.

5.5 Marquage aux anticorps anti DNP-HRP

Pour rappel, les anticorps vont se lier à la partie DNP de l'hydrazone formée par la réaction du DNPH avec les groupements carbonyles. Cet anticorps sont liés de manière covalente à l'enzyme HRP (HRP : *horse radish peroxidase*). C'est l'activité de cette enzyme qui sera détectée grâce à des méthodes de chimiluminescence. En effet, les produits avec lesquels la membrane de nitrocellulose va être incubée vont permettre la formation enzymatique d'un composé excité. Ce composé libère son énergie sous forme lumineuse afin de pouvoir retourner à son état fondamental, ce qui va impressionner le film et permettre de visualiser les protéines carbonylées. Plusieurs essais ont été nécessaires pour cette étape dont la technique est expliquée ci-dessous.

La solution suivante (PBST) a été réalisée : tampon PBS dilué 10 fois+ 0,05% Tween 20. (Préparation du tampon PBS (à diluer 10 fois) : Na_2HPO_4 5,5 g+ NaH_2PO_4 1,6 g+ NaCl 45g+ $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 500$ ml ; pH 7,4).

Lors des essais 1 et 2, la membrane a été incubée pendant 1h dans une solution de PBST+ 5% BSA. Après 3X 10 minutes de lavages dans du PBST, la membrane a été incubée pendant 1h dans une solution de PBST + BSA 1%+ l'anticorps polyclonal anti DNP-HRP de lapin dilué 1 :1000 v : v. Les lavages suivants ont été réalisés : 3 X 10 min dans PBST et 1 X 10 min dans PBS.

Pour l'essai 3, la membrane a été laissée toute une nuit dans une solution de blocage (PBST + 3% lait en poudre)

Après 3X 10 minutes de lavage dans du PBST, la membrane a été incubée pendant 1h dans une solution de PBST + BSA 1%+ l'anticorps polyclonal anti DNP-HRP rabbit dilué 1 :750 v :v.

Les lavages suivants ont été réalisés : 2 X dans PBST, 1 X 15 min dans PBST, 4 X 5min dans PBST et 1 X 5 min dans PBS.

La révélation a été réalisée en chimiluminescence. La membrane de nitrocellulose a été incubée avec les réactifs suivants (1 :1) : *enhanced luminol reagent* et *oxidizing reagent* (Perkin Elmer) pendant 1 minute à température ambiante. Un film ECL (= *enhanced chemiluminescence* (Amersham)) a ensuite été exposé pendant 5 minutes sur la membrane.

5.6 Coloration des gels au bleu

Afin de voir si toutes les protéines avaient été transférées sur la membrane de nitrocellulose, les gels ont été colorés pendant minimum 30 min dans un mélange H_2O bidistillée/ méthanol/ acide acétique (55 : 35 : 10) + bleu de Coomassie (0,05%). Le lavage a été réalisé en présence des mêmes solvants mais sans colorant.

5.7 Coloration des gels à l'argent

(Cette coloration a été réalisée uniquement pour les essais 2 et 3).

Le gel à l'argent est un gel différent de celui utilisé pour le *western blot*, cependant, les protéines provenant du même échantillon ont été séparées simultanément sur les deux gels. Les spots obtenus sur le gel à l'argent correspondent donc normalement à ceux qui apparaissent sur la membrane de nitrocellulose. Le gel coloré à l'argent donne un aperçu de l'ensemble des protéines présentes dans l'échantillon (sensibilité de 0,5 à 1,2 ng de protéines) et nous sert de point de comparaison afin d'évaluer la pertinence des résultats obtenus après le *western blot*.

La fixation (après la première dimension) a été réalisée dans un mélange éthanol/ acide acétique/ H₂O bidistillée (120 :30 :150) pendant 1 h. Les gels ont ensuite été rincés dans une solution d'éthanol (100 ml) + acétate de sodium tri hydraté (21,7 g) + Na₂S₂O₃. 5 H₂O (0,64g) + glutaraldéhyde 50%(807 µl) avant d'être placés dans une solution de nitrate d'argent (0,3 g) + formaldéhyde 37% (100 µl) + H₂O (300 ml) pendant 30 min.

Le *developing* (à vue) a été réalisé dans une solution de Na₂CO₃ 8,75g+ formaldéhyde 37 % (70 µl) + H₂O 350 ml.

Les gels ont ensuite été fixés pendant 10 min dans une solution d'EDTA (4,4 g) + H₂O (300 ml).

.

5.8 Scanner

Les gels, membranes et films ont été scannés avec un scanner (Amersham Pharmacia Biotech.) à l'aide du programme ImageMaster 2D Platinum Software version 5.0 (Amersham Biosciences).

6 Dosages des résidus d'antibiotiques dans les muscles

Les dosages de résidus d'antibiotiques dans les muscles des crevettes soumises aux contaminations-décontaminations ont été réalisés au Laboratoire d'Analyse des Denrées Alimentaires (Prof. Maghuin-Rogister) de l'Université de Liège.

6.1 *Extraction et détection des résidus de furazolidone (nitrofurane)*

La méthode de dosage a été adaptée d'après Rhijn et al. (2003). Les échantillons (1 g de tissu musculaire) ont été homogénéisés dans du HCl 0,2 M. Les résidus libres ont été marqués via un mélange de standards internes, de HCl 0,2 mM et de 2-NBA 98% (2-nitrobenzaldéhyde) 100 mM. L'extraction a été réalisée en présence d'acétate d'éthyle (2 x 4 ml). Ensuite, le solvant a été évaporé (sous N₂) et les résidus dissous dans de l'eau. La présence (ou non) des résidus a été détectée par un spectromètre de masse «quadrupole» (LC-MSMS). La concentration en résidus est exprimée en ppb ($\mu\text{g kg}^{-1}$ de poids frais).

Note: les nitrofuranes telles que la furazolidone sont très rapidement dégradés *in vivo*. Après métabolisation au sein de la crevette puis hydrolyse de la liaison protéine-antibiotique, la furazolidone se trouve sous forme du résidu libre 3-amino-2-oxazolidone (qui est dosé ici). Il est donc impossible de doser directement la furazolidone dans l'organisme, par contre, la méthode utilisée permet de doser des métabolites des nitrofuranes, qui sont stables dans les tissus et sont encore détectables assez longtemps après l'arrêt du traitement, tel que le 3-amino-2-oxazolidone.

6.2 *Extraction et détection des résidus de quinolones (enrofloxacin)*

Les échantillons (1 g de tissu musculaire) sont extraits dans 10 ml d'acétonitrile. Après une centrifugation 10 min à 1000 X g, les surnageants sont transférés dans de nouveaux tubes et évaporés sous N₂. La purification des échantillons se réalise dans du tampon NH₄Ac. Après élution, l'échantillon est évaporé sous N₂ et de l'acide formique (pH 2,5) est ajouté dans chaque tube. Ensuite, les échantillons sont passés en LC-MC (chromatographie liquide (HPLC=chromatographie liquide à haute performance)-spectromètre de masse) avec les solvants suivants : méthanol et mélange H₂O+ NH₃ 0,1 %. La concentration en résidus est exprimée en ppb ($\mu\text{g kg}^{-1}$ de poids frais).

7 Analyses statistiques des données

Les analyses statistiques ne tiennent pas compte des valeurs obtenues à 96h pendant les contaminations et 24 h après (les contrôles n'ont pas été récoltés à ces moments).

Dans notre expérience, 3 paramètres différents sont à prendre en compte :

- Le traitement : contrôle-enrofloxacin-furazolidone est une variable indépendante ;
- Le moment d'échantillonnage (le temps) (0h et 171h pendant les contaminations et 7 jours post-contaminations) est la deuxième variable indépendante.
- L'activité enzymatique ou la concentration en MDA pour le dosage de la LPO est la variable dépendante (n=3 : ce sont les différents bassins. 4 crevettes ont été prélevées dans chaque bassin à chaque temps d'échantillonnage et leurs organes et hémolymphes ont été poolés.

Il s'agit donc d'ANOVA 2 croisées et fixes. Une différence entre 2 moyennes est considérée comme non significative lorsque le « p » est $> 0,05$, significative quand $p < 0,05$ et $> 0,01$, hautement significative quand $p < 0,01$ et $> 0,001$ et la différence est très hautement significative lorsque $p < 0,001$.

Lorsque les ANOVA mettent en évidence un effet significatif du traitement ou du temps, un test de Scheffé a été réalisé afin de distinguer quelles moyennes diffèrent des autres.

Le test préalable à l'ANOVA est le test d'homogénéité des variances (Hartley). Les variances sont considérées comme différentes lorsque le « p » obtenu est inférieur à 0,05. Dans ce cas, le test de Hartley est à nouveau réalisé mais sur les logarithmes des valeurs et une nouvelle ANOVA est également réalisée sur les logarithmes des valeurs.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel « STATISTICA ».

III Résultats

Dans cette section, nous allons présenter les résultats obtenus pour les dosages d'antibiotiques dans les muscles des crevettes et pour les marqueurs de stress oxydant. Le protocole expérimental adopté correspond autant que possible aux conditions réelles rencontrées dans les élevages de crevettes tigrées au Viêt Nam: les fermiers utilisent des antibiotiques mélangés à la nourriture à raison de 4 g d'antibiotique par kg de nourriture et les contaminations durent en moyenne 7 jours.

Pour plus de clarté, les résultats pour chaque biomarqueur sont présentés successivement pour le niveau de peroxydation lipidique, la glutathion peroxydase, la glutathion-S-transférase, la superoxyde dimutase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase, la catalase, la glutathion réductase et le glutathion total (GSH+ GSSG). Pour chaque biomarqueur, les résultats obtenus dans l'hépatopancréas, les branchies et l'hémolymphe s'il y a lieu sont décrits ci-dessous et seront discutés dans le chapitre suivant. Rappelons que les valeurs obtenues après 96h de contamination et après 24 h de décontamination ne sont pas utilisées dans les analyses statistiques mais sont toutefois reprises sur les graphes.

- Tout d'abord, les résidus d'antibiotiques ont été dosés dans la chair des crevettes afin notamment de voir si celles-ci avaient bien été contaminées. La figure ci-dessous montre les résultats obtenus.

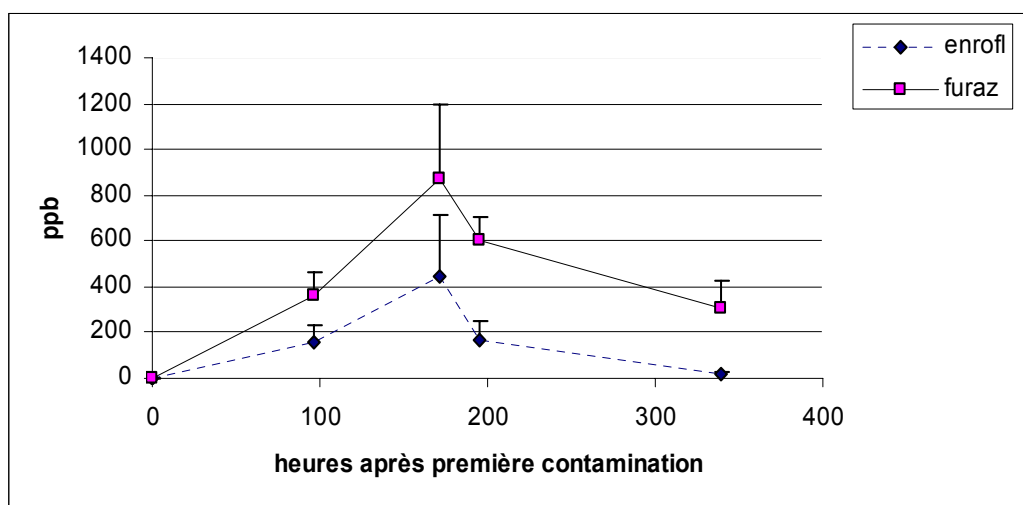


Figure 1: Concentrations en enrofloxacin et en furazolidone (sous forme 3-amino-2-oxazolidone) dans les muscles de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours ou 339 h après la première contamination).

Nous pouvons remarquer que les concentrations en résidus d'enrofloxacin et de furazolidone dans les muscles évoluent de la même façon : nulles au début des contaminations, elles augmentent après 96h de contamination pour atteindre un maximum après 7 jours. Puis les concentrations en antibiotiques diminuent, mais les résidus sont encore présents après 7 jours de décontamination ($17,3 \pm 6,4$ ppb pour l'enrofloxacin et $306,0 \pm 120,1$ ppb pour la furazolidone). On peut constater que les résidus de furazolidone sont présents en plus grande quantité que ceux d'enrofloxacin et diminuent moins rapidement que ceux-ci : il faut environ 130h pour que la concentration maximale en résidus de furazolidone diminue de moitié tandis qu'il faut moins de 24h pour que la concentration maximale en enrofloxacin diminue de moitié.

- Les résultats concernant les biomarqueurs sont décrits ci-dessous. Les graphes correspondants se trouvent sur les pages de gauche. Lorsque les analyses statistiques montrent des différences entre des moyennes, celles-ci sont signalées par des lettres différentes sur les histogrammes.

Peroxydation lipidique (LPO)

Le niveau de peroxydation lipidique, mesuré par la méthode TBARS, est environ 10 fois plus élevé dans l'hépatopancréas que dans les branchies (voir figures 2 et 3). Ce niveau est compris entre $140,2 \pm 31,1$ et $591,6 \pm 279,5$ nmol MDA g^{-1} tissu dans l'hépatopancréas et entre 20 et $84,1 \pm 64,2$ nmol MDA g^{-1} tissu dans les branchies. Les figures 2, 3 et 4 montrent les résultats obtenus respectivement pour l'hépatopancréas, les branchies et l'hémolymphe.

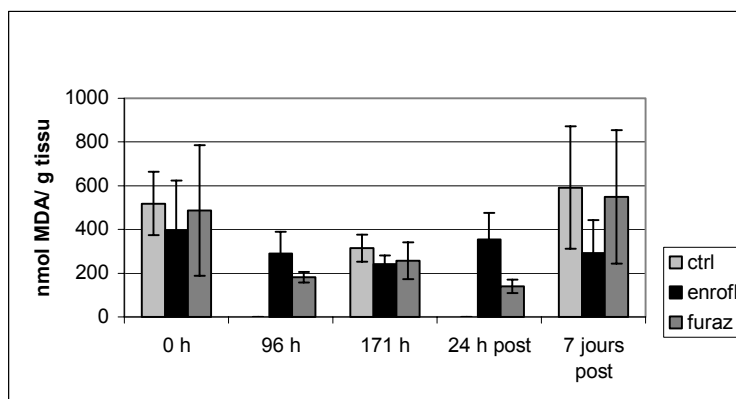


Figure 2 : Niveau de peroxydation lipidique (LPO) exprimé en nmol MDA g^{-1} de tissu dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours ou 339 h après la première contamination).

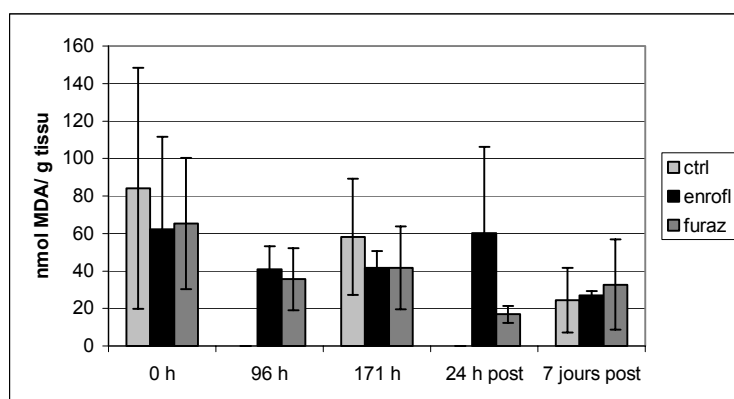


Figure 3 : Niveau de peroxydation lipidique (LPO) exprimé en nmol MDA g⁻¹ de tissu dans les branchies de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours ou 339 h après la première contamination).

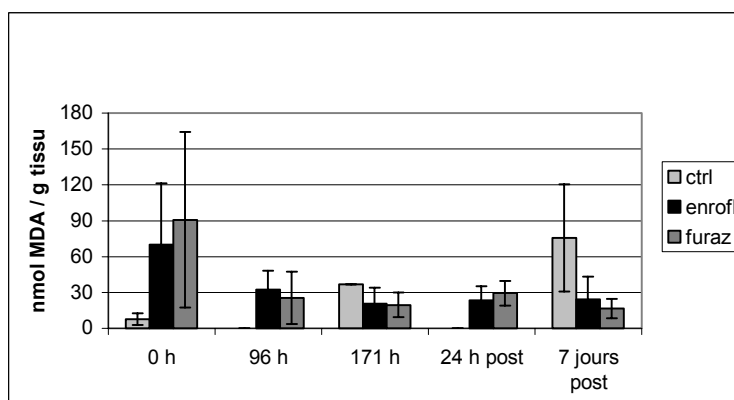


Figure 4 : Niveau de peroxydation lipidique (LPO) exprimé en nmol MDA g⁻¹ de tissu dans l'hémolymph de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours ou 339 h après la première contamination).

Les concentrations en MDA dans l'hémolymph varient quant à elles de $7,7 \pm 4,8$; à $90,7 \pm 73,4$ nmol MDA g⁻¹ de tissu.

Les tests ANOVA ne montrent aucun effet significatif, ni du temps ni des antibiotiques, que ce soit dans l'hépatopancréas, les branchies ou l'hémolymph.

- **Glutathion peroxydase (GPx)**

Aucune tendance ne peut être mise en évidence concernant l'évolution de l'activité de la GPx, représentée aux figures 5 et 6. Dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée, l'activité de la GPx varie entre $65,7 \pm 19,1$ et $148,6 \pm 13,5$ nmol NADPH oxydées $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protéines, tandis que dans les branchies, l'activité varie de $21,8 \pm 8,1$ à $140,4 \pm 36,3$ nmol NADPH oxydées $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protéines.

Ceci est confirmé par les analyses statistiques qui ne mettent en évidence aucun effet du traitement ou du temps dans les organes étudiés.

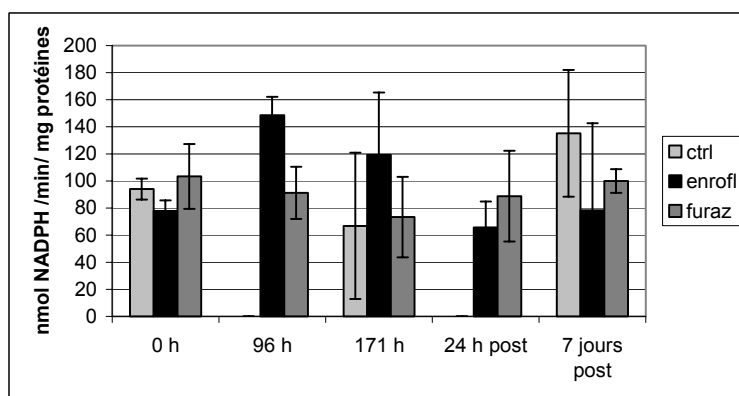


Figure 5 : Activité de la glutathion peroxydase (GPx) en nmol NADPH oxydées $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protéines dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours ou 339 h après la première contamination).

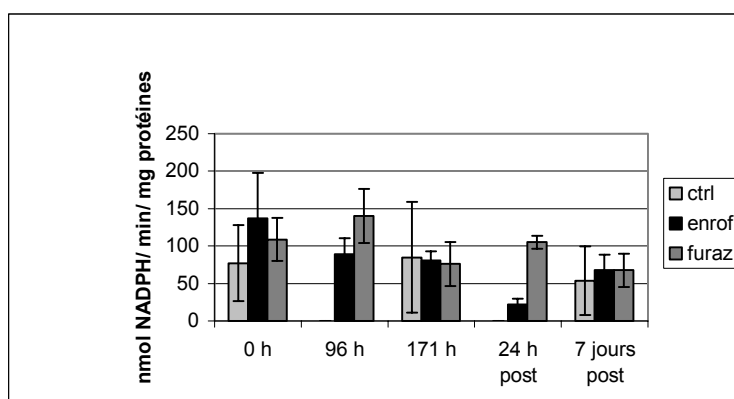


Figure 6 : Activité de la glutathion peroxydase (GPx) en nmol NADPH oxydées $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protéines dans les branchies la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours ou 339 h après la première contamination).

Glutathion-S-transférase (GST)

L'activité de la GST dans l'hépatopancréas est assez faible avant les contaminations par rapport aux autres temps d'échantillonnage: elle est comprise entre $25,4 \pm 3,9$ et $29,4 \pm 2,4$ nmol CDNB $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protéines (figure 6) tous traitements confondus. Ensuite elle augmente et se situe entre $115,4 \pm 15,9$ et $183,9 \pm 105,9$ nmol CDNB $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protéines. Ceci est confirmé par le test ANOVA qui montre un effet très hautement significatif du temps dans l'hépatopancréas ($p=0.00001$). La moyenne de 0h diffère de toutes les autres valeurs comparées, c'est-à-dire 171h et 7 jours post-contaminations. Par contre, il n'y a pas d'effet significatif du traitement ($p=0,7$). La figure 7 ci-dessous reprend les résultats obtenus.

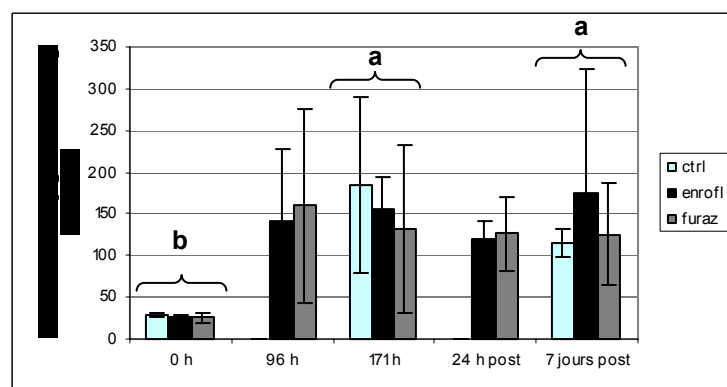


Figure 7 : activité de la glutathion-S-transférase (GST) en nmol CDNB conjuguées $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéines dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours ou 339 h après la première contamination).

L'activité de la GST est assez stable dans les branchies où elle est comprise entre $120,4 \pm 20,2$ et $195,0 \pm 44,1$ nmol CDNB $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protéines comme le montre la figure 8.

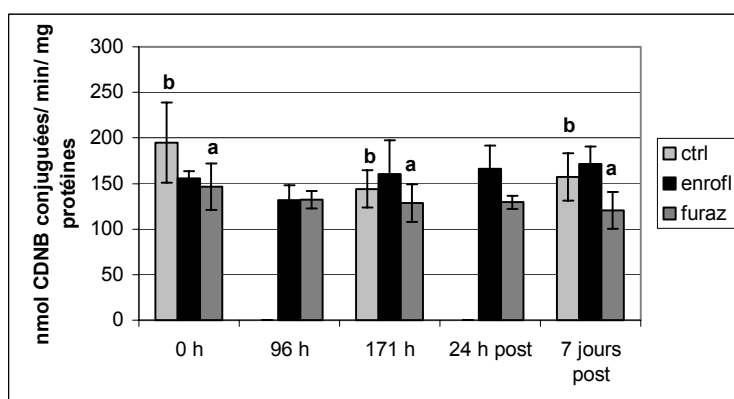


Figure 8 : activité de la glutathion-S-transférase (GST) en nmol CDNB conjuguées $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéines dans les branchies de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours ou 339 h après la première contamination).

Cependant l'activité de la GST des individus contaminés à la furazolidone est plus basse que celle des contrôles (A 171h : respectivement $144,0 \pm 20,4$ et $128,5 \pm 20,7$ nmol CDNB min⁻¹ mg⁻¹ protéines pour les contrôles et la furazolidone et à 7 jours, $157,1 \pm 26,1$ et $120,4 \pm 20,2$ nmol CDNB min⁻¹ mg⁻¹ protéines pour les contrôles et la furazolidone). En effet, l'ANOVA montre un effet significatif du traitement sur l'activité de la GST dans les branchies et le test de Scheffé indique que les moyennes qui diffèrent entre elles sont celles des contrôles et des individus traités à la furazolidone ($p = 0.048$). Ici, il n'y a pas d'effet significatif du temps ni d'effet croisé entre le traitement et le temps et la différence entre furazolidone et enrofloxacin n'est pas significative ($p = 0.07$).

Superoxyde dismutase (SOD)

Dans l'hépatopancréas, l'activité de la SOD varie du simple au triple depuis le premier jour des contaminations à la furazolidone ($59,7 \pm 12,4$ U mg⁻¹ protéines) à 7 jours après la fin de celles-ci ($145,1 \pm 56,3$ U mg⁻¹ protéines). On peut constater sur la figure 8 que les valeurs obtenues 7 jours après les contaminations sont plus élevées que pour les autres temps d'échantillonnage, comme l'indique également l'ANOVA : l'effet du temps est très hautement significatif ($p = 0,0001$) et les valeurs de 7 jours post-contaminations diffèrent de toutes les autres valeurs. Néanmoins, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet des antibiotiques ($p = 0,6$).

Dans les branchies, l'activité de la SOD est comprise entre $49,8 \pm 26,8$ et $295,1 \pm 142,0$ unités mg⁻¹ de protéines. L'ANOVA ne montre pas d'effet du temps ou des antibiotiques sur l'activité de la SOD dans les branchies, même si une tendance à une diminution, indépendamment du traitement, est observée.

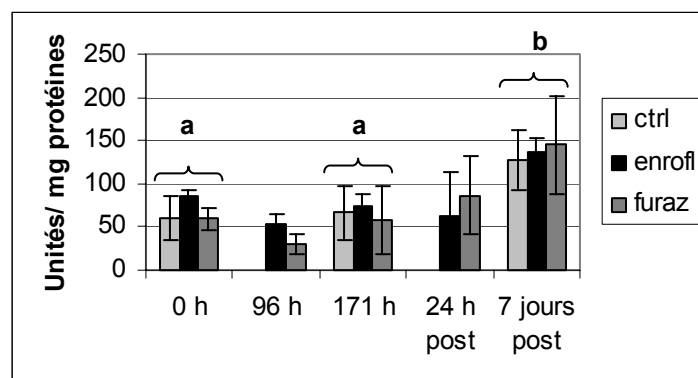


Figure 9: Activité de la superoxyde dismutase totale (SOD) exprimée en unités de SOD mg⁻¹ de protéines dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours ou 339 h après la première contamination).

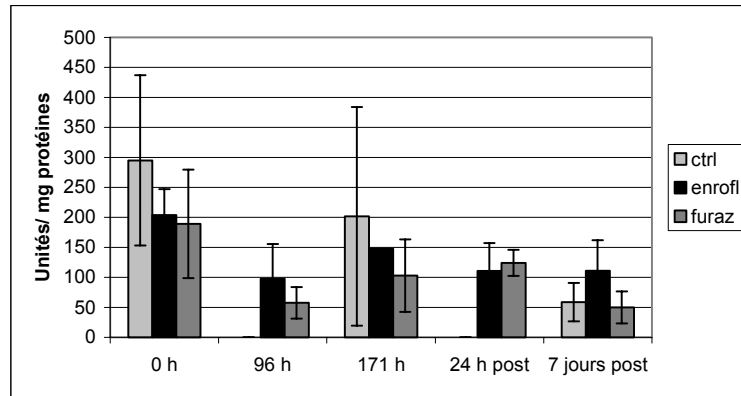


Figure 10 : Activité de la superoxyde dismutase totale (SOD) exprimée en unités de SOD mg⁻¹ de protéines dans les branchies de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours ou 339 h après la première contamination).

Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH)

L'activité de la G6PDH n'a pas pu être décelée dans l'hépatopancréas, quel que soit le traitement et le temps d'exposition. Dans les branchies de la crevette tigrée, l'activité varie entre 38,9 et 45,8 nmol NADPH min⁻¹ mg⁻¹ protéines avant les contaminations et est plus élevée après 7 jours de contaminations, où elle se situe entre 55,3 et 69 nmol NADPH min⁻¹ mg⁻¹ protéines. L'activité trouvée à 171h pendant les contaminations est quant à elle comprise entre 42,0 et 53,0 nmol NADPH min⁻¹ mg⁻¹ protéines.

L'ANOVA confirme cet effet du temps qui est hautement significatif ($p = 0.004$). Les moyennes de 7 jours post-contaminations diffèrent des moyennes du temps « 0h » ($p = 0,2$) mais pas des moyennes de 171h. Par contre, il n'y a pas d'effet du traitement ($p = 0,06$). La figure 11 montre les différentes activités de la G6PDH durant l'expérience.

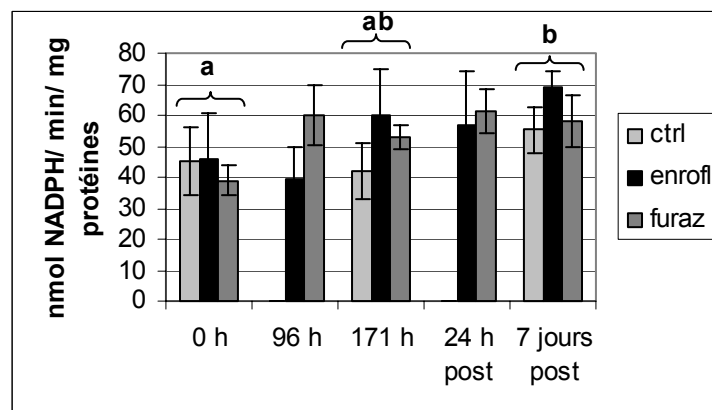


Figure 11: Activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase en nmol NADPH oxydées min⁻¹ mg⁻¹ protéines dans les branchies de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours ou 339 h après la première contamination).

Catalase

L'activité de la catalase est assez stable. Elle se situe entre $0,02 \pm 0,003$ et $0,03 \pm 0,02$ U de catalase mg^{-1} protéines dans l'hépatopancréas et entre $0,04 \pm 0,01$ et $0,2 \pm 0,03$ U mg^{-1} protéines dans les branchies. Elle est donc environ 10 fois plus élevée dans les branchies que dans l'hépatopancréas. Les ANOVA ne montrent aucun effet significatif du traitement ou du temps dans l'hépatopancréas. Par contre, un effet très hautement significatif du temps ($p=0,0005$) a pu être observé dans les branchies. alors qu'il n'y a pas d'effet du traitement ($p=0,1$). Dans cet organe, les valeurs moyennes après 171 h de contamination et après 7 jours de décontamination sont supérieures aux valeurs au temps 0.

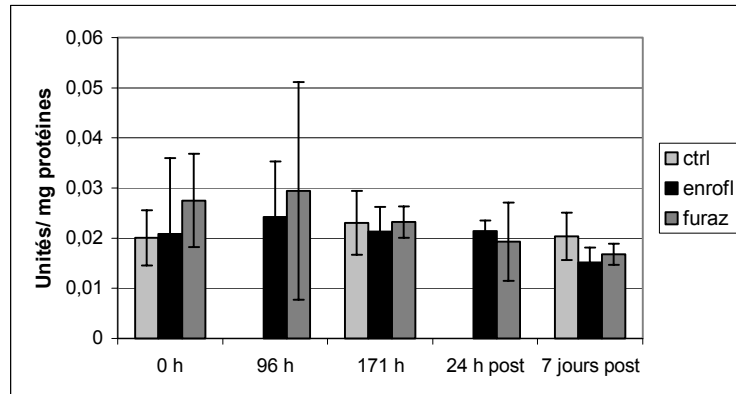


Figure 12: Activité de la catalase exprimée en unités de catalase mg^{-1} de protéines dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours ou 339 h après la première contamination).

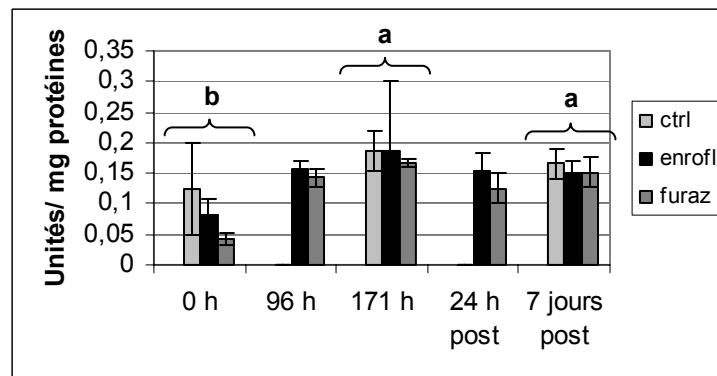


Figure 13 : Activité de la catalase exprimée en unités de catalase mg^{-1} de protéines dans les branchies de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours ou 339 h après la première contamination).

Autres biomarqueurs

Aucun résultat n'a été obtenu avec la glutathion réductase (GR) et le glutathion total dans aucun des organes étudiés. De même, nous n'avons pas pu obtenir de données concernant l'activité de la G6PDH dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée.

Analyse protéomique

Rappelons que nous avons testé ici une méthodologie qui permet de mettre en évidence l'état de carbonylation des protéines. Plusieurs essais ont été nécessaires pour optimiser au mieux la technique. Pour chaque essai, après dérivatisation des protéines carbonylées au DNPH, un film a été obtenu après marquage via un anticorps, ainsi qu'une membrane sur laquelle apparaissent normalement toutes les protéines de l'échantillon via une coloration FastStain. Les spots sur le film correspondent donc aux protéines oxydées et peuvent être comparés aux protéines totales visibles sur la membrane. Nous avons également obtenu à chaque essai une image du gel coloré au bleu de Coomassie après le transfert des protéines, ce qui permet de visualiser les protéines qui restent sur le gel après ce transfert. Une image d'un autre gel coloré au nitrate d'argent a également été obtenue : ceci permet de représenter la majorité des protéines présentes dans l'échantillon.

Le premier film obtenu (fig. 14) présente de nombreuses taches qui ne sont pas des spots de protéines. De plus, très peu de protéines basiques sont visibles. Pour le deuxième essai, les échantillons ont été traités avec un kit « *clean-up* » (protocole détaillé en annexe) qui permet de précipiter les protéines et d'éviter une présence trop importante de sels dans l'échantillon (Les figures 15 à 18 sont représentées en vis-à-vis à la fin de ce chapitre pour plus de clarté). Les nombreuses taches retrouvées sur la première membrane (fig.14) n'étaient plus visibles sur le film 2. (fig.17). Cependant, il restait des protéines sur le gel après le transfert (en effet, on retrouve sur la membrane les spots qui apparaissent sur le gel coloré au bleu, voir fig. 16). De plus, très peu de protéines sont visibles et les protéines basiques sont rares. Le gel coloré au nitrate d'argent présente de nombreux spots de protéines du côté acide mais, comme sur la membrane, très peu de protéines sont retrouvées du côté basique du gel.

On peut également constater sur la figure 17 que les spots sont très peu visibles. Nous avons laissé plus de temps d'exposition du film sur la membrane mais le bruit de fond était assez important.

Cependant, on peut discerner quelques spots de protéines qui sont retrouvés à la fois sur la membrane, le film et les gels à l'argent et au bleu de Coomassie. Ces spots sont entourés sur les figures 15 à 18.

Suite à ces résultats, nous avons décidé de modifier d'autres paramètres tels que la composition du tampon de lyse : La concentration en détergent (chaps) a été augmentée et du SB 3-10, un autre détergent, a été ajouté afin de tenter de solubiliser davantage de protéines basiques.

La durée du transfert (*western blot*) a été augmentée sans toutefois dépasser 2 heures de sorte que les protéines de faible poids moléculaire ne sortent pas de la membrane.

Pour éviter trop de liaisons non spécifiques de l'anticorps sur la membrane, le temps de blocage par des protéines « inertes » peut être augmenté. La température de 4°C permet de diminuer encore le nombre de liaisons non spécifiques (6). De plus, nous avons utilisé du lait en poudre à la place de la BSA et sa concentration a été diminuée : 3% au lieu de 5%. Il faut savoir que si la concentration en protéines « inertes » lors du blocage est trop importante, des sites spécifiques peuvent également être bloqués sur la membrane.

(6) <http://perso.wanadoo.fr/vincent.masson/bioch/western.htm>

La visibilité des spots peut être accentuée si la quantité d'anticorps utilisée est plus importante. Cependant, une concentration trop élevée d'anticorps tend à augmenter le nombre de liaisons non spécifiques de celui-ci sur la membrane, de plus, les coûts des produits sont assez élevés. Nous avons pris la décision de diluer l'anticorps dans un rapport v : v 1 :750 plutôt que 1 :1000. Ceci devrait permettre de visualiser plus facilement les spots et par conséquent de diminuer le temps d'exposition du film, ce qui permet de minimiser encore le « bruit de fond ».

Le résultat obtenu est montré figure 20. On peut constater que le bruit de fond est toujours présent et que, comme dans les premiers essais, quasi aucune protéine n'est visible dans la partie centrale du gel, c'est-à-dire aux pH intermédiaires. Ce même résultat est retrouvé sur le gel coloré à l'argent (fig.19, gel 3a). Seuls quelques rares spots de protéines sont retrouvés sur le gel coloré au bleu (fig.19, gel 3b). Les paramètres de la première dimension pour chaque essai sont renseignés dans le tableau suivant.

Tableau 1: Paramètres de la première dimension (iso-electric focusing) pour les différents essais.

	Essai 1 (enrofloxacin 171h)	Essai 2 (Contrôle 171h)	Essai 3 (enrofloxacin 171h)
Total	4350 V h ⁻¹	11 018 V h ⁻¹	7678 V h ⁻¹
Durée	4h42	4h30	4h37
	4478 V	6000 V	4830 V
Ampérage	49 µA	44 µA	50 µA

IV Discussion et perspectives

Rappelons que la culture de crevettes est importante au Viêt Nam. Les fermiers n'hésitent pas à employer de nombreux antibiotiques (tels que des quinolones et nitrofuranes) afin d'éviter l'apparition de maladies qui peuvent diminuer la productivité des fermes et être la source de pertes financières importantes. Cependant, ces antibiotiques pourraient avoir des effets négatifs sur la santé des crevettes elles-mêmes. Plusieurs études ont en effet montré que certains antibiotiques sont source de stress oxydant ou ont un impact sur le statut rédox des organismes contaminés. Chez des poulets contaminés à la furazolidone pendant 3 jours (300 mg d'antibiotique kg^{-1} de nourriture), les activités de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase et de la glutathion réductase (GR) diminuent, de même que le rapport GSH/ GSSG, alors que le niveau de peroxydation lipidique augmente (Sas, 1993). De même, dans des cellules de dindon incubées à la furazolidone, Stroo et Schaffer (1989) montrent que la peroxydation lipidique a plus que doublé par rapport aux contrôles. Très peu d'études ont cependant été réalisées sur les effets éventuels des antibiotiques sur les crustacés en général et sur les crevettes en particulier.

Au vu de ces résultats, nous pouvons nous demander si l'utilisation d'antibiotiques n'a pas un effet sur l'état de santé des crevettes tigrées *Penaeus monodon*. Nous nous sommes intéressés à deux antibiotiques fréquemment utilisés dans les élevages de crevettes : une quinolone, l'enrofloxacin, et un nitrofurane, la furazolidone. Les crevettes ont été nourries pendant 7 jours avec la nourriture mélangée aux antibiotiques (4g d'antibiotique kg^{-1} de nourriture), afin que le protocole expérimental corresponde autant que possible aux conditions réelles, c'est-à-dire celles rencontrées dans les élevages de crevettes au Viêt Nam.

Tout d'abord, les **résidus d'antibiotiques** ont été dosés dans les muscles. Il s'avère que les crevettes exposées via la nourriture ont bien été contaminées car des résidus d'enrofloxacin et de furazolidone ont été mis en évidence dans leurs muscles. Ces résidus sont retrouvés jusqu'à 7 jours après la dernière exposition pour les deux antibiotiques. Le temps de disparition des antibiotiques dans les muscles va dépendre de nombreux facteurs, tels que le transfert de la substance dans l'hémolymph et le temps de demi-vie du médicament. Très peu d'études ont été réalisées sur la pharmacocinétique de l'enrofloxacin et de la furazolidone dans les muscles de crustacés et à notre connaissance, les temps de demi-vie d'élimination ne sont pas connus chez la crevette tigrée. Nous n'avons pas suffisamment de points d'échantillonnage que pour calculer précisément ces temps de demi-vie. Cependant, nous avons pu constater que les résidus de furazolidone (sous forme de 3-amino-2-oxazolidone) disparaissent moins vite que ceux d'enrofloxacin : pour atteindre la moitié environ de la concentration maximale (après 7 jours de contaminations), il faut attendre aux alentours de 130h pour la furazolidone et moins de 24h pour l'enrofloxacin.

Compte tenu de ces résultats, il serait intéressant de doser les résidus d'antibiotiques dans les muscles aux temps intermédiaires pendant les contaminations et plus tard, par exemple jusqu'à un mois de décontamination (les crevettes sont généralement commercialisées et consommées après un laps de temps de 28 jours après la dernière utilisation d'antibiotiques). En effet, les résidus de furazolidone sont encore assez élevés dans les muscles après 7 jours de décontamination. De la furazolidone risque donc d'être détectée dans la chair des crevettes exportées si les animaux ont été traités avec cet antibiotique moins d'un mois avant d'être mis sur le marché, ce qui rendrait le stock invendable et donc serait source de perte financière pour les fermiers concernés. En effet, différents règlements existent, notamment en Union Européenne, qui interdisent totalement la présence de furazolidone dans les aliments importés et fixent des limites précises de détection pour l'enrofloxacin et d'autres antibiotiques (Règlements CE 315/ 93 ; CE 466/ 2001 et CEE 2377/ 99).

Certains fermiers respectent déjà des temps de « décontamination » entre le dernier usage d'antibiotique et la récolte (par exemple, les crevettes ne sont récoltées que 15 jours environ après la dernière utilisation d'acide oxolinique (Kestemont *et al.*, 2005)), mais ce temps risque d'être trop court si les résidus subsistent plus longtemps dans la chair. Une fois les résultats connus, il faudrait informer les fermiers des différents temps de décontamination nécessaires, mais également des effets des antibiotiques et de leur utilisation sans danger pour les fermiers comme pour l'environnement de la ferme et les consommateurs.

Une analyse de la concentration en antibiotique présente dans l'eau pourrait également être réalisée. Cette concentration risque d'être assez faible car la nourriture non consommée a été retirée régulièrement des bassins. Ceci pourrait néanmoins donner une idée de la quantité d'antibiotique directement en contact avec les branchies puisque celles-ci sont en contact avec l'eau. De plus, la furazolidone a un effet significatif uniquement sur les branchies et pas sur l'hépatopancréas. La furazolidone directement en contact avec les tissus pourrait avoir un effet sur ceux-ci. Les résidus devraient également être dosés dans les organes eux-mêmes afin de comparer les quantités relatives en antibiotique.

La technique de dosage des résidus d'antibiotiques dans les muscles fonctionne bien chez les crevettes tigrées mais est assez difficile à appliquer dans les pays producteurs de crevettes tels que le Viêt Nam. De plus, nous savons à présent que les antibiotiques se retrouvent dans l'organisme des crevettes contaminées, mais la technique utilisée ne donne aucune indication sur l'état de santé général de ces crevettes. C'est pourquoi nous avons testé différents biomarqueurs qui peuvent nous renseigner sur l'exposition des organismes à des substances susceptibles de générer un stress oxydant, comme les antibiotiques. Ceci peut permettre de mettre en évidence un éventuel effet de ces antibiotiques sur le statut redox des crevettes.

Pour ce faire, nous avons choisi quelques **marqueurs de stress oxydant** qui ont déjà été utilisés comme tels dans d'autres études. Un des premiers biomarqueurs potentiels est la peroxydation lipidique (LPO). De nombreux auteurs rapportent l'utilisation du niveau de LPO comme marqueur d'exposition à des polluants divers. Par exemple, chez la crevette géante d'eau douce, la concentration en substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) varie de environ 4 à 14 nmol TBARS mg⁻¹ de protéines lorsque des individus sont exposés pendant 30 minutes à une substance pro-oxydante telle que le Fe SO₄ (Dandapat *et al.*, 2000, voir tableau 1).

Le même effet des polluants sur le niveau de peroxydation lipidique a été retrouvé chez le poisson-chat hélicoptère *Wallago attu* Bloch et Schneider (1801) par Pandey *et al* (2003) : chez cet organisme, le niveau de peroxydation lipidique est plus élevé pour des individus qui vivent dans un milieu relativement pollué plutôt que chez des poissons provenant d'un milieu moins pollué. Le niveau de peroxydation lipidique semble donc assez sensible aux substances oxydantes et pourrait nous renseigner sur le statut rédox des crevettes étudiées.

Dans notre expérience, des crevettes tigrées contaminées par de l'enrofloxacin ou de la furazolidone pendant 7 jours ne présentent aucune variation du niveau de peroxydation lipidique dans les organes étudiés, c'est-à-dire l'hépatopancréas, les branchies et l'hémolymphe. Ceci laisse supposer que, dans nos conditions expérimentales (proches des conditions trouvées dans les fermes), l'enrofloxacin comme la furazolidone n'ont pas d'effet sur la peroxydation des lipides.

Chez la crevette tigrée, le niveau de peroxydation lipidique est environ 10 fois plus élevé dans l'hépatopancréas que dans les branchies. Ce même rapport est retrouvé chez la moule verte asiatique *Perna viridis* Linné (1758) par Cheung *et al.* (2002). Cependant, chez le poisson-chat hélicoptère, c'est dans les branchies que le taux de peroxydation lipidique est le plus élevé (Pandey *et al.*, 2003, voir tableau 1). Toutefois, les valeurs maximales de 600 nmol MDA g⁻¹ tissu obtenues dans notre étude pour la crevette tigrée semblent relativement élevées : dans la littérature, les valeurs obtenues dépassent rarement 100 nmol MDA g⁻¹ tissu. Par contre, les concentrations en MDA dans les branchies de la crevette tigrée correspondent à celles obtenues chez le poisson-chat hélicoptère (tableau 1). Il est malheureusement difficile de comparer ces résultats avec ceux obtenus chez la crevette géante d'eau douce car les unités utilisées sont différentes.

Même si les antibiotiques utilisés ici n'ont pas d'effet sur l'oxydation des lipides, nous ne pouvons pas affirmer qu'ils n'ont pas d'effet sur d'autres macromolécules. En effet, les lipides ne sont pas la seule cible de l'oxydation. L'absence de variation du niveau de peroxydation lipidique n'exclut pas un effet sur d'autres structures biologiques, telles que les protéines ou l'ADN (Sergent *et al.*, 2001).

De plus, le niveau de peroxydation lipidique n'est pas le seul indicateur possible de stress oxydant. Ainsi, il existe dans l'organisme des systèmes antioxydants (enzymatiques et non enzymatiques) qui sont susceptibles d'être stimulés ou inhibés suite à une exposition à des substances pro-oxydantes, afin notamment de neutraliser les ROS produites. Nous avons voulu savoir si l'enrofloxacin et la furazolidone avaient un effet sur le système antioxydant de la crevette tigrée. Les biomarqueurs potentiels suivants ont été testés dans l'hépatopancréas et les branchies des crevettes : le glutathion total (GSH+ GSSG), des enzymes du métabolisme du glutathion (glutathion réductase (GR), glutathion-S-transférase (GST), glutathion peroxydase (GPx) et glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH)) et des enzymes de protection contre les espèces réactives de l'O₂ (la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase).

Les résultats obtenus ne montrent aucun effet du traitement sur l'activité de la GPx, de la catalase, de la G6PDH et de la SOD dans les organes des crevettes tigrées. En général, les valeurs d'activité obtenues pour ces enzymes sont cohérentes avec celles trouvées dans d'autres organismes en conditions normales (les résultats de dosage de ces enzymes sur d'autres espèces sont reprises dans les tableau 2,3,4 et 5). Par exemple, dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée, l'activité de la **GPx** varie entre 65,7± 19,1 et 148,6± 13,5 nmol NADPH min⁻¹ mg⁻¹ protéines, tandis que dans les branchies, l'activité varie de 21,8± 8,1 à 140,4± 36,3 nmol NADPH min⁻¹ mg⁻¹ protéines. Dans l'hépatopancréas de la crevette géante d'eau douce, l'activité de la GPx comprise entre 100 et 125 nmol NADPH min⁻¹ mg⁻¹ protéines et dans les branchies de cette espèce, elle se situe légèrement au-dessus de 150 nmol NADPH min⁻¹ mg⁻¹ protéines (Dandapat *et al.*, 2000). L'activité de la GPx chez la crevette tigrée est légèrement plus basse que chez un autre crustacé, le crabe vert (Gamble *et al.*, 1994, voir tableau 2).

Concernant la **SOD**, l'activité de cette enzyme est légèrement plus élevée dans l'hépatopancréas que dans les branchies de la crevette tigrée, comme chez la crevette d'eau douce de mousson et la crevette géante d'eau douce (Arun et Subramanian, 1998 ; Dandapat *et al.*, 2000 ; voir tableau 3).

L'activité de la **G6PDH** trouvée dans les branchies de la crevette tigrée est 2 à 3 fois plus faible que celle trouvée dans les branchies du poisson-chat hélicoptère par Pandey *et al.* (2003). Cette activité augmente chez ce poisson lorsque celui-ci se trouve dans un milieu pollué (par rapport à un site de référence peu pollué) (Pandey *et al.*, 2003, voir tableau 4).

Enfin, les valeurs d'activité de la **catalase** trouvées dans la littérature (tableau 5) vont dans l'autre sens que chez la crevette tigrée, pour laquelle l'activité de cette enzyme est 10 fois plus élevée dans les branchies que dans l'hépatopancréas. En effet, chez la crevette d'eau douce de mousson, l'activité de la catalase est environ 1,5 fois plus élevée dans l'hépatopancréas que dans les branchies. Chez les poissons tels que le poisson-chat hélicoptère, l'activité de la catalase est également plus importante dans le foie que dans les branchies (Arun et Subramanian, 1998 ; Pandey *et al.*, 2003).

Nous n'avons pas obtenu de résultat pour la glutathion réductase (**GR**). Plusieurs raisons pourraient l'expliquer. La technique utilisée n'est peut-être pas assez sensible pour détecter une activité très faible. En effet, le protocole utilisé fonctionne correctement dans le foie du poisson rouge *Carassius auratus* Linné (1758) (résultats non montrés). Mais chez les poissons, l'activité de la GR semble plus élevée que chez les crustacés en général : elle est environ 15 fois plus élevée chez le poisson-chat hélicoptère que chez la crevette géante d'eau douce, dont l'activité de la GR est très faible : environ 5 nmol NADPH oxydées min⁻¹ mg⁻¹ protéines dans l'hépatopancréas et environ 14 nmol NADPH oxydées min⁻¹ mg⁻¹ protéines dans les branchies (Pandey *et al.*, 2003 ; Dandapat *et al.*, 2000, voir tableau 6).

De même, le **glutathion** total n'a pu être dosé dans aucun organe étudié.

Au vu de ces premiers résultats, l'utilisation d'enrofloxacin et de furazolidone en conditions réelles ne semble pas avoir d'effet sur le statut rédox de la crevette tigrée. En tous cas, les enzymes telles que la GR, la GPx, la G6PDH, la SOD et la catalase ne paraissent pas appropriées pour jouer un rôle de biomarqueurs dans les crevettes tigrées suite à l'utilisation d'antibiotiques.

Cependant, un effet de la furazolidone a tout de même été observé sur les branchies de la crevette tigrée : l'activité de la glutathion-S-transférase (GST) diminue de façon très hautement significative dans les branchies des individus traités à la furazolidone (dont la formule est rappelée figure 1). Rappelons que la **GST** est une enzyme qui détoxifie les xénobiotiques électrophiles en catalysant une réaction de conjugaison entre le glutathion et des molécules réactives qui contiennent des sites électrophiles tels que des atomes de carbone, d'azote ou de soufre. La GST a également un rôle antioxydant en protégeant l'organisme contre des produits du stress oxydant. Malheureusement, très peu d'études ont été réalisées sur l'effet des antibiotiques sur la GST.

L'effet de la furazolidone sur la GST est visible après 171h de contamination et il est encore présent après 7 jours de décontamination. A ce moment, les résidus de furazolidone trouvés dans les muscles sont encore importants (306 µg kg⁻¹ de poids frais). Cependant, nous ne disposons pas des données concernant les résidus d'antibiotiques dans les branchies et l'hépatopancréas. Il serait intéressant de connaître les quantités présentes dans ces organes ainsi que le temps de demi-vie de l'enrofloxacin et de la furazolidone. Il serait alors possible de mettre en relation la concentration en antibiotique dans les organes étudiés et l'effet de ceux-ci sur les biomarqueurs.

Deux hypothèses peuvent être envisagées : la furazolidone pourrait avoir un effet inhibiteur sur la protéine elle-même ou bien elle pourrait aussi agir sur l'expression du gène de la GST. Des études ultérieures sont nécessaires pour vérifier ces hypothèses :

- L'antibiotique peut être directement appliqué sur l'homogénat. Dans ce cas, une éventuelle inhibition de l'enzyme sera décelée de suite avec les techniques de dosage de l'activité de la GST.
- Le niveau d'expression du ou des gènes de la GST peut être étudié grâce à des techniques telles que la RT-PCR (*real-time polymerase chain reaction*) ou via des microdamiers.

Quelques facteurs pourraient expliquer le fait que l'activité de la GST soit diminuée dans les branchies des animaux contaminés à la furazolidone alors qu'elle n'est pas affectée dans l'hépatopancréas. Ceci ne sont que des hypothèses et sont donc à prendre avec la plus grande prudence. Ainsi, les systèmes de détoxification de l'hépatopancréas pourraient être plus abondants que dans les branchies, diminuant par là l'effet de la furazolidone dans l'hépatopancréas. L'accumulation de l'antibiotique pourrait être plus forte dans les branchies que dans l'hépatopancréas. Doser les résidus d'antibiotiques dans ces deux organes permettrait de connaître les concentrations relatives des antibiotiques et *pourrait* aider à expliquer pourquoi l'effet de la furazolidone ne se marque que sur les branchies. Une autre hypothèse est que la concentration en GSH soit plus élevée dans l'hépatopancréas que dans les branchies (ce qui est le cas chez le poisson-chat hélicoptère, dont la concentration en glutathion total en conditions normales est environ 6 fois plus élevée que dans les branchies (Pandey *et al.*, 2003 ; voir tableau 7)). Ceci permettrait aux résidus de furazolidone susceptibles d'inhiber la GST d'être moins disponibles dans l'hépatopancréas (étant liés au glutathion) et par là de diminuer leur effet sur l'activité enzymatique dans cet organe.

La furazolidone est déjà connue pour inhiber certaines enzymes impliquées dans le stress oxydant. Une étude a montré que dans certaines conditions, cet antibiotique pouvait diminuer l'activité de la catalase et de la GR dans le foie et les poumons de poulet après 5 jours de décontamination (Sas, 1993). Cependant, l'activité de la GST augmente lorsque des organismes tels que le poisson-chat hélicoptère sont exposés à des polluants (tableau 8). De même, un des dérivés de la furazolidone, la 3-amino-2-oxazolidone ou AOZ, peut causer des dommages irréversibles sur les groupements prosthétiques (c'est-à-dire non protéiques) des enzymes, dégrader les chaînes d'acides aminés des enzymes et fragmenter l'ADN de façon irréversible (Zolla et Timperio, 2005).

Mis à part cet effet du traitement, un effet du temps a également été observé pour plusieurs enzymes, aussi bien sur les contrôles que sur les individus traités : dans les branchies, l'activité de la G6PDH et de la catalase varient au cours de l'expérience. Dans l'hépatopancréas, cet effet se marque sur les activités de la GST et de la SOD. Pour la SOD dans l'hépatopancréas et la G6PDH dans les branchies, l'activité enzymatique est plus élevée après 7 jours de décontamination. Pour la catalase dans les branchies et la GST dans l'hépatopancréas, cette augmentation se remarque déjà après 96h.

Ces résultats tendraient à indiquer que les conditions expérimentales elles-mêmes sont une source de stress chez les crevettes. En effet, celles-ci sont restées assez longtemps dans les bassins (14 jours d'acclimatation + 7 jours de contamination + 7 jours de décontamination), conditions peu naturelles. Cela a peut-être un impact sur l'état général des organismes. Cependant, l'activité générale des animaux (nage, sauts vigoureux) était comparable à celle du début de l'expérience et aucune mortalité n'a été constatée durant toute la durée de l'expérience.

Une autre hypothèse concerne la croissance des crevettes. Celles-ci étant des subadultes, certaines ont mué durant l'expérience. De 10 à 12 g au début de l'expérience, les plus grandes crevettes pesaient jusqu'à 28g lors des derniers échantillonnages. Des changements dans la physiologie des organismes apparaissent pendant la croissance. La modification de certains paramètres pourraient influencer les biomarqueurs testés. Des études ultérieures devraient tenir compte de ces variations.

Au vu de ces résultats, la furazolidone aurait un effet sur l'activité d'une seule enzyme testée, la GST dans les branchies. Rappelons qu'un des intérêts de cette étude est de trouver des biomarqueurs potentiels susceptibles de nous renseigner sur la présence d'antibiotiques dans l'organisme des crevettes sans devoir mesurer la concentration en résidus dans les muscles. Seule l'activité de la GST dosée dans les branchies pourrait jouer ce rôle.

Cependant, quelques points resteraient à tester avant de pouvoir utiliser la GST comme biomarqueur. Par exemple, une seule concentration en antibiotique a été prise en compte. Il serait intéressant de comparer différentes doses afin de trouver une éventuelle relation dose-effet. Comme nous l'avons cité plus haut, l'âge des crevettes pourrait influencer l'activité enzymatique. Les effets éventuels de l'âge et de la taille devraient donc être pris en compte. De même, l'effet de paramètres extérieurs tels que la température et la salinité pourraient être étudiés. D'autres critères restent également à tester, tels que l'effet du régime alimentaire et l'effet du cycle de reproduction. De plus, il est peu probable que l'activité GST seule soit spécifique à l'utilisation de furazolidone, si bien qu'il faudrait certainement l'utiliser conjointement avec d'autres biomarqueurs.

Néanmoins, ce travail ne représente qu'une première approche. D'autres biomarqueurs non liés au stress oxydant mais impliqués dans la détoxification de xénobiotiques pourraient être dosés, notamment l'activité de l'acétylcholine estérase, l'expression des HSPs (*heat shock protein*) et l'activité des enzymes du cytochrome P450 telles que l'EROD (7-ethoxyresorufin-O-deethylase). En effet, des enzymes du cytochrome P450 interviennent dans le métabolisme de l'enrofloxacin (Vaccaro *et al.*, 2003). Un effet éventuel de l'enrofloxacin serait peut-être décelé plus facilement en étudiant de telles enzymes.

Idéalement, les biomarqueurs étudiés devraient également pouvoir être dosés dans l'hémolymphe. Les activités enzymatiques dans l'hémolymphe sont parfois très faibles, d'où la nécessité de travailler avec de grandes quantités d'échantillon. Travailler sur l'hémolymphe a l'avantage d'être non invasif, c'est-à-dire de ne pas tuer l'animal. Cela permettrait un suivi plus facile des biomarqueurs puisqu'il « suffirait » de prélever de l'hémolymphe des crevettes récoltées dans les élevages.

Il serait également intéressant de pouvoir doser le glutathion total dans les crevettes tigrées. En effet, une étude montre que le contenu en glutathion total diminue lorsque de la furazolidone est administrée par voie intrapéritonéale à des souris (Hunder *et al.*, 1987). Des résidus de nitrofuranes peuvent être conjugués au glutathion réduit chez le singe japonais (Asaoka et Takahashi, 1989). De plus, le glutathion joue un rôle important dans le statut redox de la cellule et certaines enzymes étudiées ici interviennent dans son métabolisme (GPx, GR, G6PDH, et GST). De même, l'effet du traitement qui a pu être observé sur les branchies concerne une des enzymes du métabolisme du glutathion, la GST. Enfin, il serait utile de connaître les concentrations relatives en glutathion réduit (GSH) et en glutathion oxydé (GSSG) dans les crevettes tigrées : le rapport GSH/ GSSG montrerait peut-être des variations suite aux différents traitements.

Enfin, comme nous l'avons dit plus haut, les résidus d'antibiotiques devraient être dosés dans les branchies et dans l'hépatopancréas des crevettes afin de connaître la concentration en antibiotiques présents dans ces organes. Les branchies étant en contact direct avec l'eau contaminée, ceci entraînerait peut-être une concentration plus importante en antibiotiques dans ces tissus.

Analyse protéomique

Il existe des méthodes qui permettent d'évaluer le degré d'oxydation (carbonylation) des protéines par une **analyse protéomique**. Très peu d'études de ce genre existent en écotoxicologie. Ces dernières consistent le plus souvent à mettre en évidence des signatures d'expression protéiques (SEPs) différentes suite à un stress environnemental induit par des xénobiotiques (Knigge *et al.*, 2004 ; Shrader *et al.*, 2003 ; Manduzio *et al.*, 2004).

La plupart du temps, ces études ne s'intéressent pas aux protéines carbonylées. La carbonylation des protéines a déjà été utilisée par quelques auteurs afin de mettre en évidence un stress oxydant, mais à notre connaissance, aucun travail de ce genre n'a jamais été effectué sur des crustacés suite une exposition à des xénobiotiques.

Une mise au point de la technique a été nécessaire en ce qui concerne la mise en évidence des protéines carbonylées dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée. Le premier résultat marquant est que, dans cet organe, certaines protéines sont effectivement carbonylées. En effet, nous avons pu retrouver sur les films (après dérivatisation des protéines carbonylées par du DNPH et marquage via un anticorps anti-DNP) des spots de protéines qui correspondent à des spots retrouvés sur la membrane, qui contient normalement la plupart des protéines de l'échantillon. Les protéines visibles sur le film sont les protéines carbonylées.

Cependant, nous n'avons pas pu comparer les contrôles et les individus traités. Nous ne pouvons donc pas affirmer que cette carbonylation est due à un stress oxydant généré par l'antibiotique ou si certaines protéines sont carbonylées naturellement chez la crevette tigrée. De plus, il faudrait comparer les résultats obtenus sur des individus traités avec des antibiotiques et sur les contrôles au point de vue du niveau d'expression des spots qui apparaissent sur les films. Il serait également intéressant de déterminer quelles protéines sont les plus sujettes à l'oxydation chez la crevette tigrée (via des gels en 2 dimensions (gels 2D) et des techniques de spectrométrie de masse), et aussi de quantifier la quantité de protéines carbonylées par rapport aux protéines totales en comparant les protéines présentes sur la membrane avec les protéines carbonylées, visibles sur le film

Comme nous l'avons cité plus haut, nous n'avons pas pu montrer un effet des antibiotiques sur la carbonylation des protéines dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée mais la technique utilisée semble fonctionner sur cet organisme. A terme, il serait envisageable d'utiliser la carbonylation de certaines protéines comme biomarqueur. . Néanmoins, cela demanderait de nombreuses études. Pour rappel, la méthodologie utilisée se réalise en plusieurs étapes : après une séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique, les protéines carbonylées sont dérivatisées au DNPH et les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire (il s'agit de gels 2D). Ensuite, un *western blot* est réalisé, puis les protéines dérivatisées sont marquées avec un anticorps et la révélation se fait en chimioluminescence.

Le protocole résumé ci-dessus semble applicable sur l'hépatopancréas de la crevette tigrée même si quelques problèmes techniques subsistent encore : très peu de protéines basiques sont visibles sur les membranes et sur les gels colorés à l'argent.

V Conclusions

L'objectif de ce travail était d'étudier l'état général de stress oxydant dans les crevettes tigrées suite à l'utilisation d'antibiotiques dans les élevages.

Après avoir testé différents biomarqueurs potentiels, nous pouvons retenir que le stress oxydant semble faible chez les crevettes, car seule l'activité de la glutathion-S-transférase (GST) dans les branchies est affectée. L'activité de cette enzyme pourrait donc être utilisée comme biomarqueur chez la crevette tigrée *Penaeus monodon*. L'utilisation de plusieurs biomarqueurs pourra permettre de vérifier facilement la présence d'antibiotiques dans les organismes et d'éviter ainsi que des stocks contaminés ne soient refusés à l'exportation dans d'autres pays. De plus, comme nous avons montré un effet des antibiotiques sur les crevettes, nous pouvons nous demander si les pratiques adoptées dans les élevages de crevettes n'ont pas un impact sur la santé de ces organismes. Ceci pourrait être étudié dans des travaux ultérieurs. Les antibiotiques devraient être utilisés plus raisonnablement en vue d'éviter des problèmes engendrés par les antibiotiques eux-mêmes sur la santé des crevettes, ce qui pourrait avoir un effet négatif sur la productivité.

VI Références bibliographiques

- Arun, S., Subramanian, P. Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **121**, 273-277 (1998)
- Asakoa, K., Takahashi, K. Glutathione conjugation of nitro compounds by monkey glutathione-S-transferases. *Biochemical Pharmacology* **38**, 2977-2983 (1989)
- Ayes, K., Mustafa, S., Rahman, R.A. Broodstock condition and egg quality in tiger prawn, *Penaeus monodon*, resulting from feeding bioencapsulated live prey. *Aquaculture International* **12**, 423-433 (2004)
- Bachère, E. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* **191**, 3-11 (2000)
- Bainy, A. C. D. Biochemical responses in penaeids caused by contaminants. *Aquaculture* **191**, 163-168 (2000)
- Baudhuin, P., Beaufay, H., Rahman-Li, Y., Sellinger, O.Z., Wattiaux, R., Jacques, P., De Duve, C. Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat-liver tissue. *Biochemical Journal* **92**, 179-184 (1964)
- Bhavan, P. S., Geraldine, P. Biochemical stress responses in tissues of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* on exposure to endosulfan. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **70**, 27-41 (2001)
- (A) Boyd-Kimball, D., Castegna, A., Sultana, R., Poon, H.F., Petroze, R., Lynn, B.C., Klein, J.B., Butterfield, D.A. Proteomic identification of proteins oxidized by A β (1-42) in synaptosomes: Implications for Alzheimer's disease. *Brain Research* **1044**, 206-215 (2005)
- (B) Boyd-Kimball, D., Sultana, R., Fai Poon, H., Lynn, B.C., Casamenti, F., Pepeu, G., Klein, J.B., Butterfield, D.A. Proteomic identification of proteins specifically oxidized by intracerebral injection of amyloid β -peptide (1-42) into rat brain: implication for Alzheimer's disease. *Neuroscience* **132**, 313-324 (2005)
- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of Total Environment* **247**, 295-311 (2000)
- Carlberg, I., Mannervik, B. Purification and characterization of the flavo enzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry* **250**, 5475-5480 (1975)
- Chen, S. N. Current status of trade in cultured shrimp. *Rev. Sci. Tech.* **15**, 517-521 (1996)
- Cheung, C.C.C., Zheng, G.S., Lam, P.K.S., Richardson, B.J. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin* **45**, 181-191 (2002)
- Choi, J., Conrad, C.C., Malakowsky, C.A., Talent, J.M., Yuan, C.S., Gracy, R.W. Flavones from *Scutellaria baicalensis* Georgi attenuate apoptosis and protein oxidation in neuronal cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta* **1571**, 201-210 (2002)

(A) Conrad, C.C., Marshall, P.L., Talent, J.M., Malakowsky, C.A., Choi, J., Gracy, R.W. Oxidized proteins in Alzheimer's plasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **275**, 678-681 (2000)

(B) Conrad, C.C., Talent, J.M., Malakowsky, C.A., Choi, J., Gracy, R.W. Post-electrophoretic identification of oxidized proteins. *Biological Procedures Online* vol. 2 No. 1 (2000)

Conrad, C.C., Choi, J., Malakowsky, C.A., Talent, J.M., Dai, R., Marshall, P., Gracy, R. Identification of protein carbonyls after two- dimensional electrophoresis. *Proteomics* **1**, 829-834 (2001)

Corsin, F., Phi, L. H., Phuoc, L. H., Tinh, N. T. N., Hao, N. V., Mohan, C. V., Turnbull, J. F., Morgan, K. L. Problems and solutions with the design and execution of an epidemiological study of white spot disease in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Vietnam. *Preventive Veterinary Medicine* **53**, 117-132 (2002)

Dandapat, J., Chainy, G. B. N., Rao, K. J. Dietary vitamin-E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **127**, 101-115 (2000)

Das, B., Khan, Y. S., Das, P. Environmental impact of aquaculture- sedimentation and nutrient loading from shrimp culture of the southeast coastal region of the Bay of Bengal. *Journal of Environmental Science* **16**, 466-470 (2004)

Demers, D. Les radicaux libres: une question d'équilibre. (1999)
<http://www3.sympatico.ca/diane.demers/rech3.htm>

FAO. Fisheries global information system (FIGIS): species fact sheet. (2005)
<http://www.fao.org/figis/servlet/species?fid=3405>

Fatima, M., Ahmad, I., Sayeed, I., Athar, M., Raisuddin, S. Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues. *Aquatic Toxicology* **49**, 243-250 (2000)

Flohé, L., Günzler, W.A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* **105**, 114-121 (1984)

Fratelli, M., Demol, H., Puype, M., Casagrande, S., Elberini, I., Salmona, M., Bonetto, V., Mengozzi, M., Duffieux, F., Miclet, E., Bachi, A., Vandekerckhove, J., Gianazza, E., Ghezzi, P. Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 3505-3510 (2002)

Galindo-Reyes, J. G., Dalla Venezia, L., Lazcano-Alvarez, G., Rivas-Mendoza, H. Enzymatic and osmoregulative alterations in white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to pesticides. *Chemosphere* **40**, 233-237 (2000)

Gamble, S.C., Goldfarb, P.S., Porte, C., Livingstone, D.R. Glutathione peroxidase and other antioxidants enzyme function in marine invertebrates (*Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* and *Asteria rubens*). *Marine Environmental Research* **39**, 191-195 (1995)

Garrett, R.H., Grisham, C.M. Biochimie. De Boeck Université (2000).

Ghezzi, P., Bonetto, V. Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics* **3**, 1145-1153 (2003)

Glock, G.E., McLean, P. Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochemical Journal* **55**, 400-408 (1953)

Gräslund, S., Holström, K., Wahlström, A. A field survey of chemicals and biological products used in shrimp farming. *Marine Pollution Bulletin* **46**, 81-90 (2003)

Groth, A. Effects of carnitine on growth, survival and body composition of juvenile tiger shrimps, *Penaeus monodon* (Fabricius 1798), in pond culture (Iloilo, Philippines). Thèse de doctorat, Université de Brême. (1997)

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biology and Chemistry* **249**, 7130-7139 (1974)

Hayes, J. D., Flanagan, J. U., Jowsey, I. R. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **45**, 51-88 (2005)

Holmström, K., Gräslund, S., Wahlström, A., Pongshompoo, S., Bengtsson, B-E., Kautsky, N. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *International Journal of Food Science and Technology* **38**, 255-266 (2003)

Hunder, G., Schmid, A., Mayring, L. Investigation on the metabolic degradation of the side chain of furazolidone. *Archives of Toxicology* **61**, 161-163 (1987)

Islam, Md. S., Wahab, Md. A., Tanaka, M. Seed supply for coastal brackishwater shrimp farming: environmental impacts and sustainability. *Marine Pollution Bulletin* **48**, 7-11 (2004)

Jaiyen, A., Limsuwan, C., Chanratchakul, P., Chinabut, S. Study on distribution of oxytetracycline in black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). *The Aquatic Animal Health Research Institute Newsletter* vol. 2, **1** (1993)

Johnston, D., Van Trong, N., Van Tien, D., Xuan, T. T. Shrimp yields and harvest characteristics of mixed shrimp- mangrove forestry farms in southern Vietnam: factors affecting production. *Aquaculture* **188**, 263-284 (2000)

Kautsky, N., Rönnbäck, P., Tedengren, M., Troell, M. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* **191**, 145-161 (2000)

Kestemont, P., Maghuin-Rogister, G., Nguyen Thanh, P., Dang Vu, B. Improvement of shrimp production, sustainability and safety in Vietnam: 1st annual report. Avril 2004-avril 2005

Khoa, L. V., Hatai, K., Aoki, T. *Fusarium incarnatum* isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius, with black gill disease cultured in Vietnam. *Journal of Fish Disease* **27**, 507-515 (2004)

Kiatpathomchai, W., Jitrapakdee, S., Panyim, S., Boonsaeng, V. RT-PCR detection of yellow head virus (YHV) infection in *Penaeus monodon* using dried haemolymph spots. *Journal of Virological Methods* **119**, 1-5 (2004)

Knigge, T., Monsinjon, T., Andersen, O.K. Surface-enhanced laser desorption /ionization-time of flight-mass spectrometry approach to biomarker discovery in blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to polyaromatic hydrocarbons and heavy metals under field conditions. *Proteomics* **4**, 2722-2727 (2004)

Laragione, T., Bonetto, V., Casoni, F., Massignan, T., Bianchi, G., Gianazza, E., Ghezzi, P. Redox regulation of surface protein thiols: Identification of integrin α -4 as a molecular target by using redox proteomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 14 737-14 741 (2003)

Le, T.X., Munekage, Y. Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangroves areas in Viet Nam. *Marine Pollution Bulletin* **49**, 922-929 (2004)

- Le Bourg, E. Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letters* **498**, 183-186 (2001)
- Lightner, D. V., Redman, R. M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* **164**, 201-220 (1998)
- Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap., C., Leboulenger, F., Rocher, B. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/ Zn superoxide dismutase and of glutathione-S-transferase. *Aquatic Toxicology* **70**, 83-93 (2004)
- Mary, J., Vouquier, S., Picot, C. R., Perichon, M., Petropoulos, I., Friguet, B. Enzymatic reactions involved in the repair of oxidized proteins. *Experimental Gerontology* **39**, 1117-1123 (2004)
- Mc Donagh, B., Tyther, R., Sheehan, D. Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: Actin as a target for oxydative stress. *Aquatic Toxicology* **73**, 315-326 (2005)
- Mockett, R.J., Bayne, A.C., Sohal, B.H., Sohal, R.S. Biochemical assay of superoxide dismutase activity in *Drosophila*. *Methods in Enzymology* **349**, 287-292 (2002)
- Mohandas, J., Marshall, J.J., Duggin, G.G., Horvath, J.S., Tiller, D.J. Low activities of glutathione-related enzymes as factors in the genesis of urinary bladder cancer. *Cancer Research* **44**, 5086-5091 (1984)
- Moriarty, D. J. W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* **164**, 351-358 (1998)
- Mourente, G., Díaz-Salvago, E. Characterization of antioxidant systems, oxidation status and lipids in brain of wild- caught size- class distributed *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) Crustacea, Decapoda. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **124**, 405-416 (1999)
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., van der Knaap, W.P.W., Mialhe, E., Bachère, E. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* **191**, 89-107 (2000)
- Otta, S.K., Karunasagar, I., Karunasagar, I. Bacteriological study of shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius, hatcheries in India. *Journal of Applied Ichthyology* **17**, 59-63 (2001)
- Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Solé, M., Porte, C., Cajaraville, M. P. Antioxydant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquatic Toxicology* **58**, 75-98 (2002)
- Orbea, A., Fahimi, H. D., Cajaraville, M. P. Immunolocalization of four antioxidant enzymes in digestive glands of mollusks and crustaceans and fish liver. *Histochemistry and Cell Biology* **114**, 393-404 (2000)
- Páez-Osuna, F. The environmental impact of shrimp aquaculture: a global perspective. *Environmental Pollution* **112**, 229-231 (2001)
- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., Raisuddin, S. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Science of the Total Environment* **309**, 105-115 (2003)
- Pantoja, C. R., Lightner, D. V. Similarity between the histopathology of White Spot Syndrome Virus and Yellow Head Syndrome Virus and its relevance to diagnosis of YHV disease in the Americas. *Aquaculture* **218**, 47-54 (2003)

(A) Pellerin, J. Les biomarqueurs: définitions. (2005)
http://www3.uqar.quebec.ca/jpellerin/sem/16_biomarqueurs/biomarqueurs_def.htm

(B) Pellerin, J. Les biomarqueurs : utilisations. (2005)
http://www3.uqar.quebec.ca/jpellerin/sem/16_biomarqueurs_utilisation.htm

Primavera, J.H. What are mangroves? (Excerpts from the “proceedings of the mangrove-friendly aquaculture seminar”). (2003)

<http://www.mangroveweb.net.html/fmangrov.htm>

Rabilloud, T., Hellert, M., Gasnier, F., Luche, S., Rey, C., Aebersold, R., Benahmed, M., Louisot, P., Lunardi, J. Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 19 396-19 401 (2002)

Raes, M. Cours de Pathobiologie 2^o licence. FUNDP Namur (2005).

Reed, L. A., Siewicki, T. C., Shah, J. C. Pharmacokinetics of oxytetracycline in the white shrimp, *Litopenaeus setiferus*. *Aquaculture* **232**, 11-28 (2004)

Roch, P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* **172**, 125-145 (1999)

Rudneva, I. I. Antioxidant system of Black Sea animals in early development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **122**, 265-271 (1999)

Sas, B. Contribution to the pathobiochemistry of furazolidone-induced oxidative toxicity in chickens. *Acta Veterinaria Hungarica* **41**, 103-121 (1993)

Sergent, O., Griffon, B., Cillard, P., Cillard, J. Alcohol and oxidative stress. *Pathologie Biologie (Paris)* **49**, 689-695 (2001)

Shailaja, M.S., D'Silva, C. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere* **53**, 835-841 (2003)

Shrader, E.A., Henry, T.R., Greeley, M.S. Jr., Bradley, B.P. Proteomics in zebrafish exposed to endocrine disrupting chemicals. *Ecotoxicology* **6**, 485-488 (2003)

Schuur, A. M. Evaluation of biosecurity applications for intensive shrimp farming. *Aquacultural engineering* **28**, 3-20 (2003)

Smith, D. M., Burford, M. A., Tabrett, S. J., Irvin, S. J., Ward, L. The effect of feeding frequency on water quality and growth of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* **207**, 125-136 (2002)

Somjetlercharoen, A., Chinabut, S., Limsuwan, C. Oxolinic acid residues from *Penaeus monodon* Fabricius in intensive culture pond. *The Aquatic Animal Health Research Institute Newsletter* vol. 2, **1** (1993)

Sørensen, M., Autrup, H., Møller, P., Hertel, O., Jensen, S.S., Vinzents, P., Knudsen, L.E., Loft, S. Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutation Research* **544**, 255-271 (2003)

Stroo, W.E., Schaffer, S.W. Furazolidone-enhanced production of free radicals by avian cardiac and hepatic microsomal membranes. *Toxicology and Applied Pharmacology* **98**, 81-86 (1989)

Talent, J.M., Kong, Y., Gracy, R.W. A double stain for total and oxidized proteins for two-dimensional fingerprints. *Analytical Biochemistry* **263**, 31-38 (1998)

Tavares-Sánchez, O. L., Gómez-Anduro, G. A., Felipe-ortega, X., Islas-Osuna, M. A., Sotelo Mundo, R. R., Barillas-Mury, C., Yepiz-Plascencia, G. Catalase from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: molecular cloning and protein detection. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* **138**, 331-337 (2004)

Tendencia, E. A., de la Peña, L. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture* **195**, 193-204 (2001)

Uno, K. Pharmacokinetics of oxolinic acid and oxytetracycline in kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* **230**, 1-11 (2004)

Vaccaro, E. Giorgi, M. Longo, V., Mengozzi, G., Gervasi, P.G. Inhibition of cytochrome P450 enzymes by enrofloxacin in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Toxicology* **62**, 27-33 (2003)

van de Braak, K. Haemocytic defence in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Thèse de doctorat, université de Wageningen. (2002)

Vaseeharan, B., Ramasamy, P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology* **36**, 83-87 (2003)

Weifen, W., Hong, L., Changhu, X., Jamil, K. Elimination of chloramphenicol, sulphamethoxazole and oxytetracycline in shrimp, *Penaeus chinensis* following medicated-feed treatment. *Environment International* **30**, 367-373 (2004)

(A) Winston, G. W., Di Giulio, R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* **19**, 137-161 (1991)

(B) Winston, G. W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **100**, 173-176 (2001)

Wirth, E. F., Lund, S. A., Fulton, M. H., Scott, G. I. Reproductive alterations in adult grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, following sublethal, chronic endosulfan exposure. *Aquatic Toxicology* **59**, 93-99 (2002)

Wirth, E. F., Lund, S. A., Fulton, M. H., Scott, G. I. Determination of acute mortality in adults and sublethal embryo responses of *Palaemonetes pugio* to endosulfan and methoprene exposure. *Aquatic Toxicology* **53**, 9-18 (2001)

(A) Witteveldt, J., Cifuentes, C. C., Vlak, J. M., van Hulten, M. C. W. Protection of *Penaeus monodon* against White Spot Syndrome Virus by oral vaccination. *Journal of Virology* **78**, 2057-2061 (2004)

(B) Witteveldt, J., Vlak, J. M., van Hulten, M. C. W. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. *Fish and Shellfish Immunology* **16**, 571-579 (2004)

Yap, W.G. Shrimp culture: a global overview. (2003)
<http://www.mangroveweb.net.html/farming.htm>

Yoganandhan, K., Narayanan, R. B., Hameed, A. S. S. Larvae and early post-larvae of *Penaeus monodon* (Fabricius) experimentally infected with white spot syndrome virus (WSSV) show no significant mortality. *Journal of Fish Diseases* **26**, 385-391 (2003)

Zhang, X., Huang, C., Qin, Q. Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*. *Antiviral Research* **61**, 93-99 (2004)

Zhang, J.F., Liu, H., Sun, Y.Y., Wang, X.R., Wu, J.C., Xue, Y.Q. Responses of the antioxydant defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-dichlorophenol. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **19**, 185-190 (2005)

Zolla, L., Timperio, A.M. Involvement of active oxygen species in protein and oligonucleotide degradation induced by nitrofurans. *Biochem Cell Biol/ Biochim Biol Cell* **83**, 166-175 (2005)

Sites internet

(1) http://nis.gsmfc.org/nis_fatsheet.php?toc_id=148

(2) The situation of the world's, Vietnam's and the MD's seafood market:

http://64.233.179.104/search?q=cache:Xsz_SIRYjyQJ:143.129.203.3/cas/PDF/CAS43%2520Appendices.pdf+vietnam%2Blegislation%2Bshrimp%2Bantibiotic&hl=en&start=22&ie=UTF-8

(3) <http://www.univ-orleans.fr/sciences/BIOLOGIE/ressources/TPPV/TPdoc/TPSOD.htm>

(4) Notion d'écotoxicologie en milieu marin. (2004)

<http://www.chez.com/biomar/ecotox08.html>

(5) <http://www.theantiagingdoctor.com/39/stresschap.htm>

(6) Masson, V. Le western blot.

<http://perso.wanadoo.fr/vincent.masson/bioch/western.htm>

VII Liste des abréviations utilisées dans ce travail :

BCS : *bathocuproine disulfonic acid*;
BSA: sérum albumine bovine;
CAT : catalase ;
CDNB: 1-chloro-2,4- dinitrobenzène;
DMSO: diméthylsulfoxyde;
DTNB : acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque);
DTPA: *diethylene triamino pentaacetic acid*;
DTT: dithiothreitol;
EDTA : *ethylene diamine tetraacetic acid* ;
G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase ;
GPx : glutathion peroxydase ;
GR : glutathion réductase ;
GSH : glutathion réduit (γ -glutamylcystéinyglycine) ;
GSSG : glutathion oxydé;
GST : glutathion- S- transférase ;
H₂O : eau ;
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène ;
h: heure;
ha: hectare;
IPG : gradient de pH immobilisé (*immobilized pH gradient*) ;
kg : kilogramme
LC-MS : chromatographie liquide-spectrométrie de masse
LMR : limite maximale des résidus ;
LOO[•]: hydroperoxyde lipidique ;
LOOH : hydroperoxyde lipidique ;
LPO : peroxydation lipidique ;
MDA : malondialdéhyde ;
min : minute
mM : millimolaire
NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide ;
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite;
NADP⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ;
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite;
NBA : 2- nitrobenzaldéhyde
NBT : nitroblue tétrazolium;
nmol : nanomole ;
O₂⁻ : anion superoxyde ;
OH[•] : radical hydroxyle ;
ROS : espèces réactives de l'oxygène ;
SOD : superoxyde dismutase ;
SSA : acide 5- sulphosalicylique ;
TBA : acide thiobarbiturique;
TBARS : substances réactives à l'acide thiobarbiturique;
TCA : acide trichloroacétique;
TEMED : tétraméthylène diamine;
TiOSO₄ : oxysulfate de titane ;
Tris : Tris (hydroxyméthyl) aminométhane ;
U : unité
w/v : Poids/ volume

Chapitre 1 : Introduction

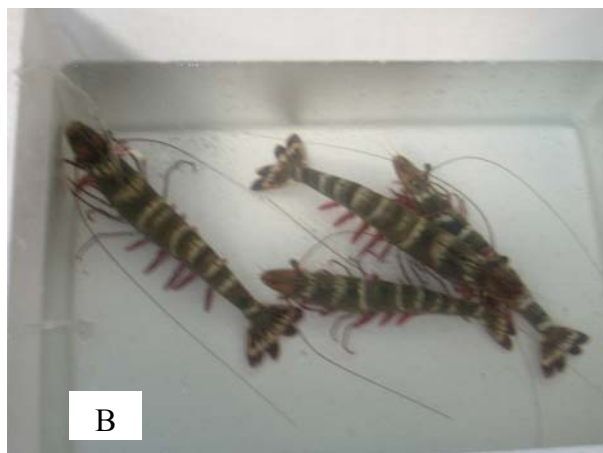
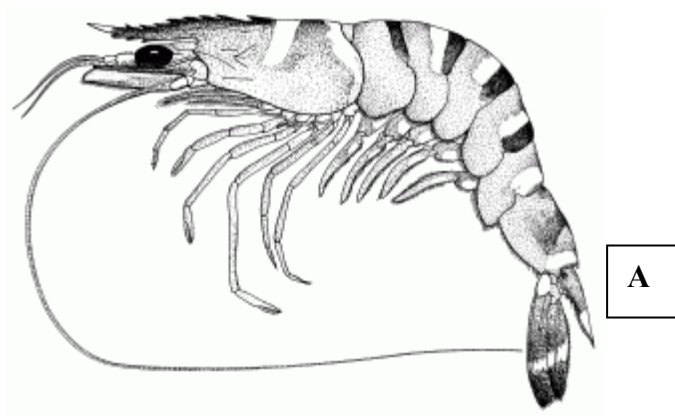


Figure 1 : A : Représentation de la crevette tigrée (*Penaeus monodon*) (FAO, 2005); B : crevettes tigrées femelles adultes (taille= 33 cm) ; C : crevette tigrée subadulte

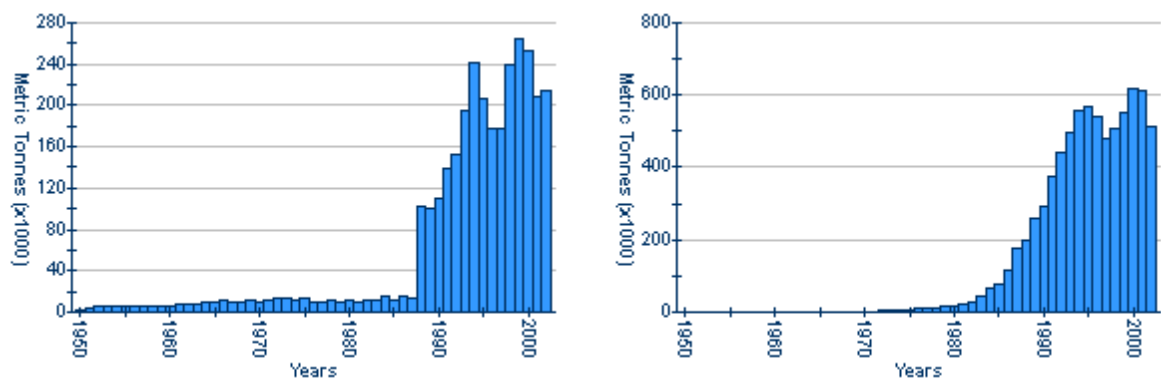


Figure 3 : A gauche : évolution mondiale du nombre de captures de crevettes tigrées sauvages. A droite : évolution de la production mondiale de crevettes tigrées provenant de l'aquaculture. (Statistiques des pêches de la FAO (FAO, 2005))

Tableau 2 : Quelques caractéristiques de différents systèmes de culture de crevettes en Asie du Sud- Est (Gräslund et al, 2001 ; Groth, 1997 ; Shuur, 2003 ; Kestemont et al.,2005). NB : les valeurs diffèrent selon les auteurs.

	EXTENSIF	SEMI- INTENSIF	INTENSIF
Superficie des étangs (ha)	0,5 -100	1-3	0,1-2
Profondeur (cm)	30-100	80-150	120-180
Densité d'élevage (nombre de juvéniles ha ⁻¹)	10 000-30 000	30 000-100 000	100 000-500 000
Densité d'élevage (nombre d'individus adultes ha ⁻¹)	300-5000	5000- 80 000	80 000-200 000 ou plus
Production (kg ha ⁻¹ an ⁻¹)	600-1500	2000-6000	7000-15 000
Aération	Aucune	Si besoin	Continue
Décharge en azote dans l'eau	Insignifiante	Moyenne	Très importante
Coût annuel d'une ferme (millions VND ha ⁻¹ récolte ⁻¹)	En moyenne : 148,64		
Prix moyen des crevettes kg ⁻¹ (VND)	96 280		

Note : 1 euro= 21 000 VND (dong vietnamien)



Figure 4 : Etang de culture intensive de crevettes tigrées (Viêt Nam).

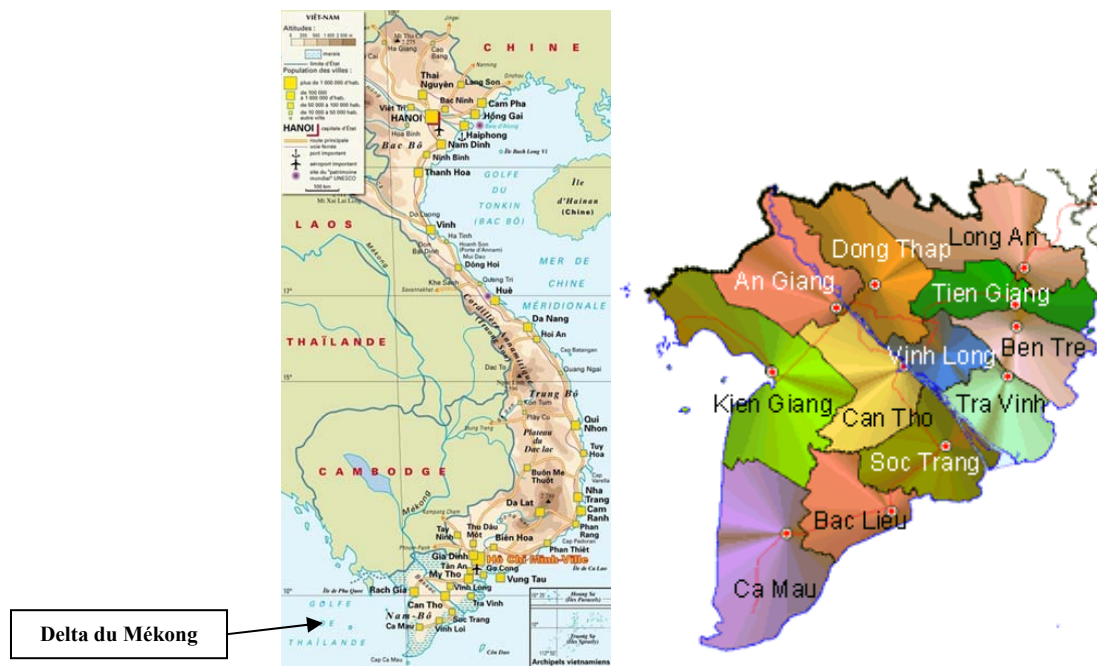


Figure 5 : A gauche : carte du Viêt Nam. A droite : carte du Delta du Mékong (Sud du Viêt Nam)

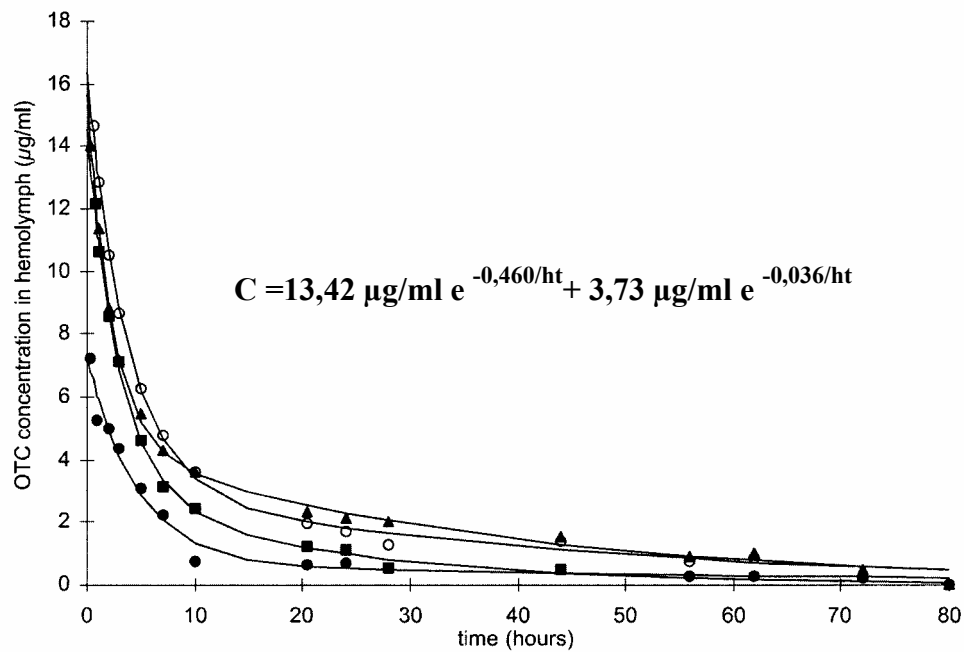


Figure 6 : Concentration en Oxytétracycline en fonction du temps (intra vasculaire). Dose de $11,1 \pm 0,7$ $\mu\text{g/g}$ de poids corporel. Chaque symbole représente un individu.
 $N=4$, $R^2 > 0,99$

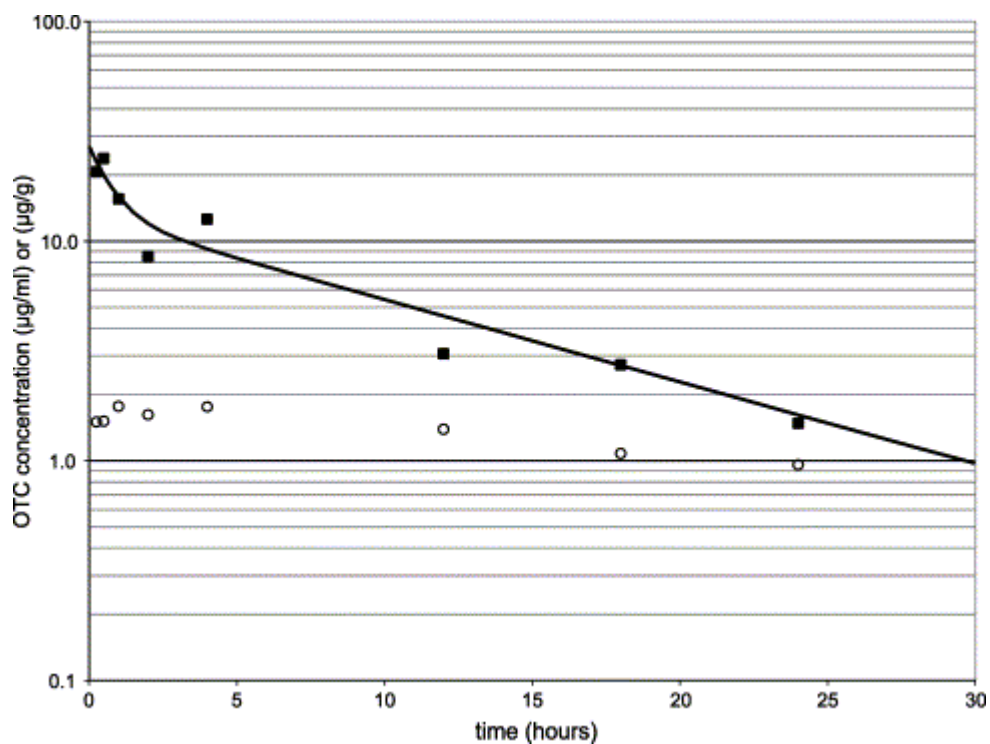


Figure 7 : Comparaison de la concentration moyenne dans l'hémolymph (■) et dans les tissus (○) suite à une injection intra-vasculaire d'oxytétracycline (trois individus sacrifiés à chaque intervalle de temps, $n=33$).

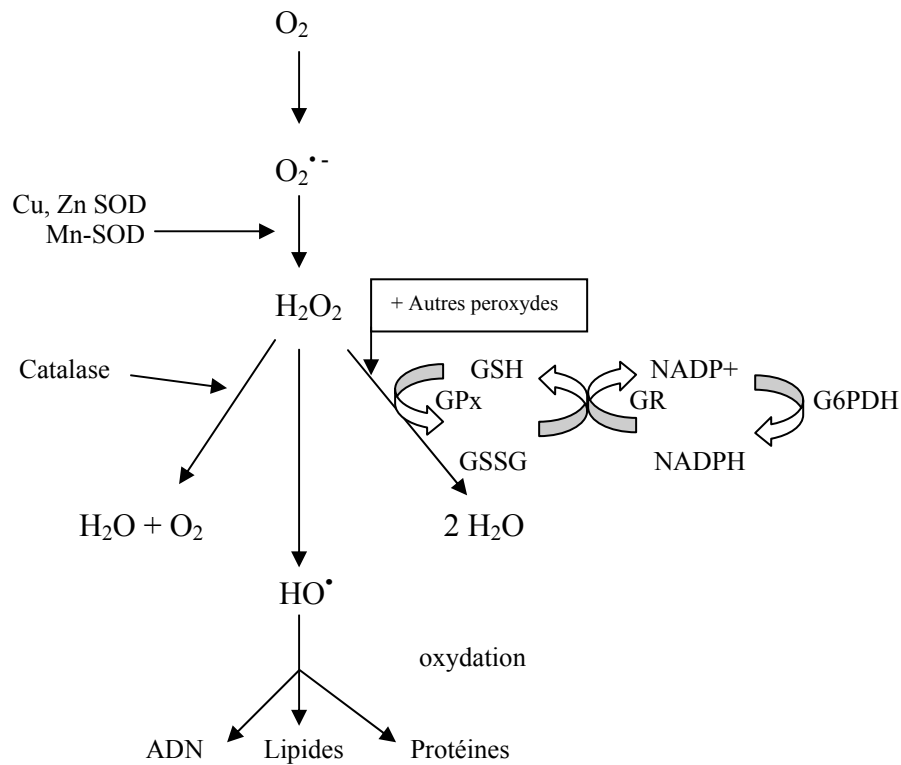


Figure 8: Résumé des principaux mécanismes du stress oxydant et de la formation de radicaux libres.
 Abréviations: $O_2^{\bullet-}$: anion superoxyde; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène; HO^{\bullet} : radical hydroxyle ; GSH: glutathion réduit; GSSG: glutathion oxydé; GR: glutathion réductase; G6PDH: glucose 6 phosphate déshydrogénase ; GPx : glutathion peroxydase.
 (D'après Mary et al, 2004 et Demers, 1999)

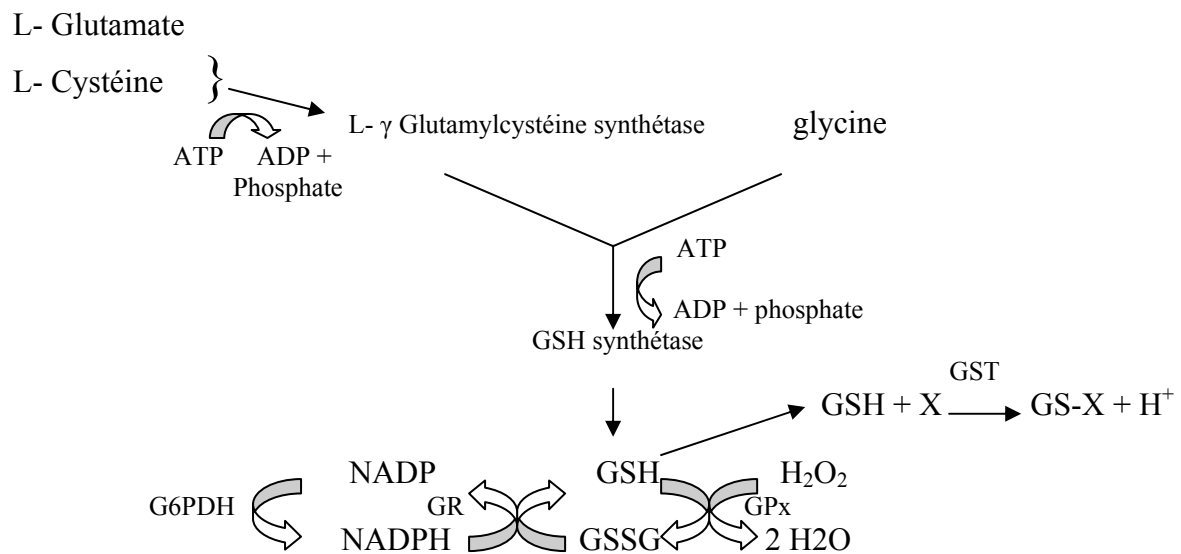


Figure 9: Schéma du métabolisme du glutathion.

Abréviations: GSH: glutathion réduit; GSSG: glutathion oxydé; GST: glutathion-S-transférase; CDNB: 1-chloro-2,4-dinitrobenzène; G6PDH: glucose 6 phosphate déshydrogénase; GR: glutathion réductase; GPx: glutathion peroxydase; H₂O₂: peroxyde d'hydrogène; NADP et NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide, formes oxydée et réduite, X: composé électrophile (tel que le CDNB par exemple).

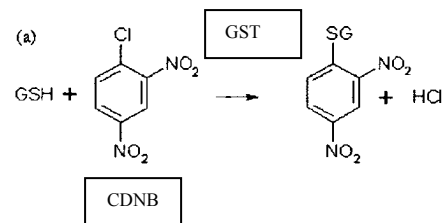


Figure 10 : Réaction de conjugaison du 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) avec le glutathion (GSH) par la glutathion-S-transférase (d'après Hayes *et al.*, 2005).

Tableau 2 : Exemple d'activités des biomarqueurs enzymatiques et autres sur différentes espèces de crevettes.

ESPECE	BIO-MARQUEUR	ORGANE	UNITES	CONDITION EXPERIMENTALE	ACTIVITE	REFERENCE
<i>A. ANTENNATUS</i>	GPx	CERVEAU	NMOL MIN ⁻¹ MG ⁻¹ PROTEINES		62,5- 94,5	(1)
<i>M. ROSENBERGII</i>	GPx	HEPATOPANCREAS	NMOL NADPH OXYDÉES MIN ⁻¹ MG ⁻¹ PROTEINES		ENTRE 100 ET 125	(2)
		BRANCHIES			UN PEU PLUS DE 150	
<i>A. ANTENNATUS</i>	GR	CERVEAU	NMOL MIN ⁻¹ MG ⁻¹ PROTEINES		78- 166	(1)
<i>M. ROSENBERGII</i>	GR	HEPATOPANCREAS	NMOL NADPH OXYDÉES MIN ⁻¹ MG ⁻¹ PROTEINES		ENVIRON 5	(2)
	GR	BRANCHIES			ENVIRON 15	(2)
<i>A. ANTENNATUS</i>	GST	CERVEAU	NMOL MIN ⁻¹ MG ⁻¹ PROTEINES		164- 268	(1)
<i>M. MALCOLMSONII</i>	GST	HEPATOPANCREAS	(MICROMOL MIN ⁻¹ MG ⁻¹ PROTEINES	STADE SUBADULTE	1,16 ± 0,04	(3)
		BRANCHIES			0,38 ± 0,021	(3)
		MUSCLES			0,67 ± 0,00	(3)
<i>A. ANTENNATUS</i>	CAT	CERVEAU	MMOL MIN ⁻¹ MG ⁻¹ PROTEINES		6,0- 67,7	(1)
<i>M. MALCOLMSONII</i>	CAT	HEPATOPANCREAS	MMOL MIN ⁻¹ MG ⁻¹ PROTEINES	STADE SUBADULTE	49,3 ± 0,8	(6)
		BRANCHIES			27,2 ± 0,4	
		MUSCLES			38,5 ± 0,3	
<i>A. ANTENNATUS</i>	SOD	CERVEAU	UNITES MG ⁻¹ PROTEINES		5,4- 9,2	(1)
<i>M. MALCOLMSONII</i>	SOD	HEPATOPANCREAS	U MIN ⁻¹ MG ⁻¹ PROTEINES	STADE SUBADULTE	32,16 ± 0,72	(3)
		BRANCHIES			21,4 ± 0,72	
		MUSCLES			16,0 ± 0,58	
<i>M. ROSENBERGII</i>	SOD	HEPATOPANCREAS	U MG ⁻¹ PROTEINES		ENVIRON 8	(2)
		BRANCHIES			ENVIRON 7	(2)
<i>A. ANTENNATUS</i>	LPO	CERVEAU	NMOL MDA G ⁻¹ CERVEAU		60,3- 123,4	(1)
<i>M. ROSENBERGII</i>	LPO	HEPATOPANCREAS	NMOL TBARS MG ⁻¹ PROTEINES	CONTROLE	ENVIRON 4	(2)
				+FESO ₄ (30MIN)	ENVIRON 14	
		BRANCHIES		CONTROLE	ENVIRON 1,5	
				+FESO ₄ (30MIN)	ENVIRON 2,5	

(1) Crevette marine rouge *Aristeus antennatus* Risso (1816); n=3. D'après Mourente et Díaz-Salvago, 1999.

(2) Crevette géante d'eau douce *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). D'après Dandapat *et al.*, 2000.

(3) Crevette d'eau douce de mousson *Macrobrachium malcolmsonii* H. Milne-Edwards (1844); n=5 ± SEM. D'après Arun *et al.*, 1998

(4)

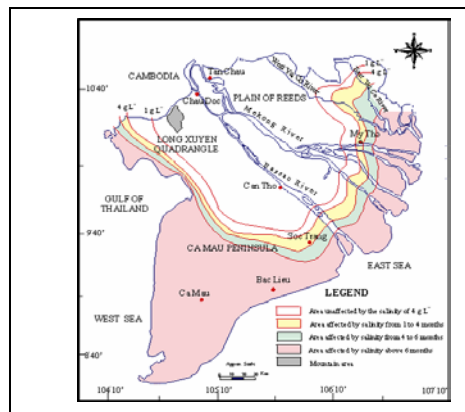


Figure 1 : Carte du Delta du Mékong (Sud du Viêt Nam)



Figure 2 .A gauche : bassins expérimentaux. A droite : le laboratoire de Cần Tho, Viêt Nam.



Figure 3 : Nourrissage des crevettes tigrées au laboratoire du College of Aquaculture and Fisheries, Cần Tho, Viêt Nam)

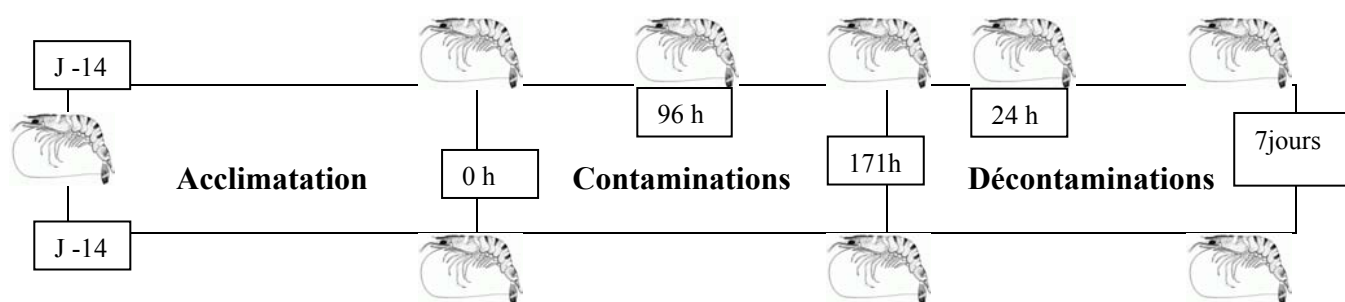


Figure 5 : Schéma expérimental.



Figure 6 : Prise d'hémolymphe

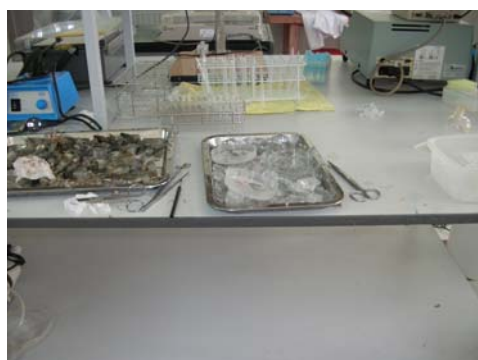


Figure 7 : Dissection des crevettes (laboratoire de Côn Tho, Việt Nam)

Chapitre 3 : résultats

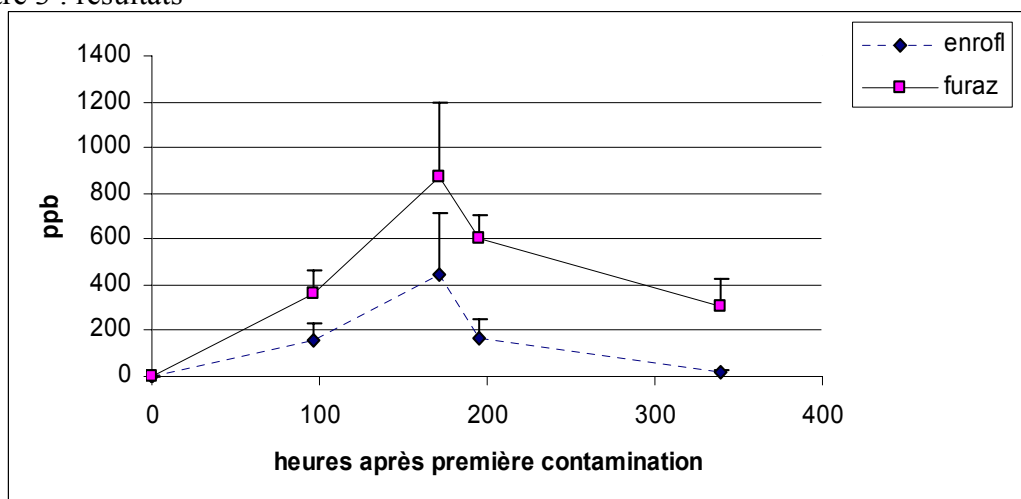


Figure 1: Concentrations en enrofloxacin et en furazolidone (sous forme 3-amino-2-oxazolidone) dans les muscles de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours).

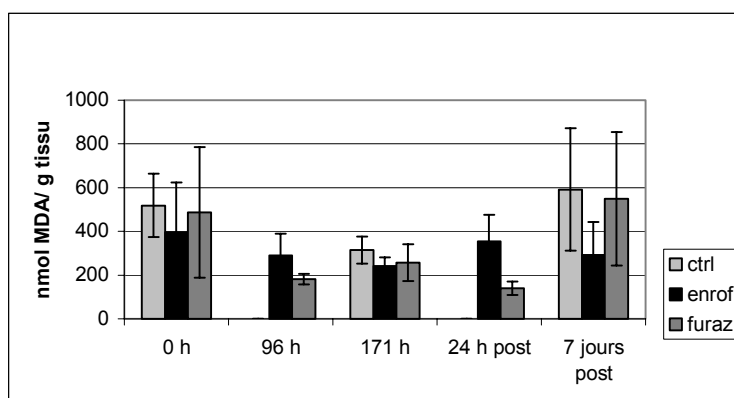


Figure 1: Niveau de peroxydation lipidique (LPO) exprimé en nmol MDA g^{-1} de tissu dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours).

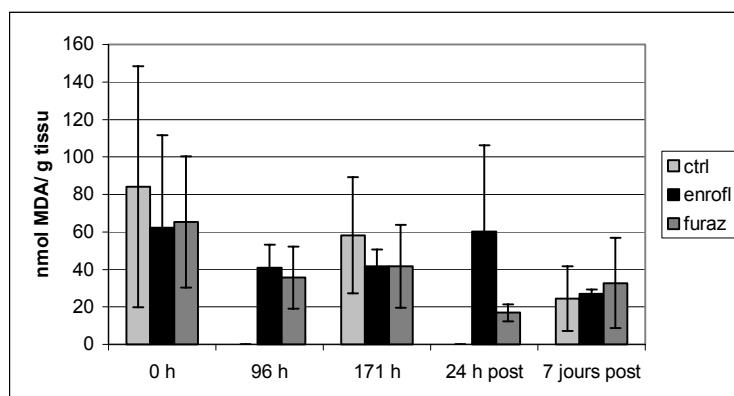


Figure 2 : Niveau de peroxydation lipidique (LPO) exprimé en nmol MDA g⁻¹ de tissu dans les branchies de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours).

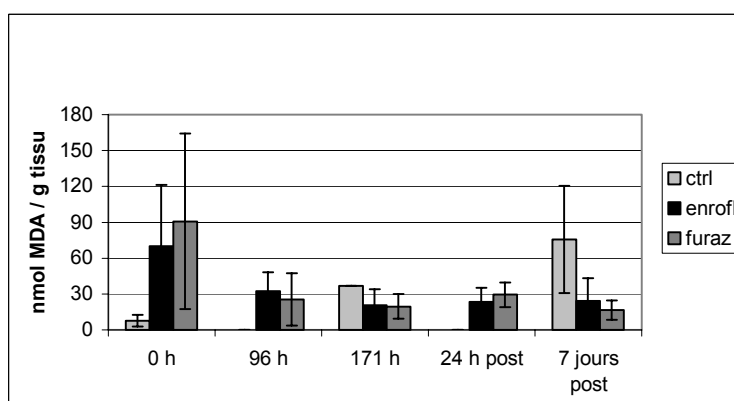


Figure 4 : Niveau de peroxydation lipidique (LPO) exprimé en nmol MDA g⁻¹ de tissu dans l'hémolymph de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours).

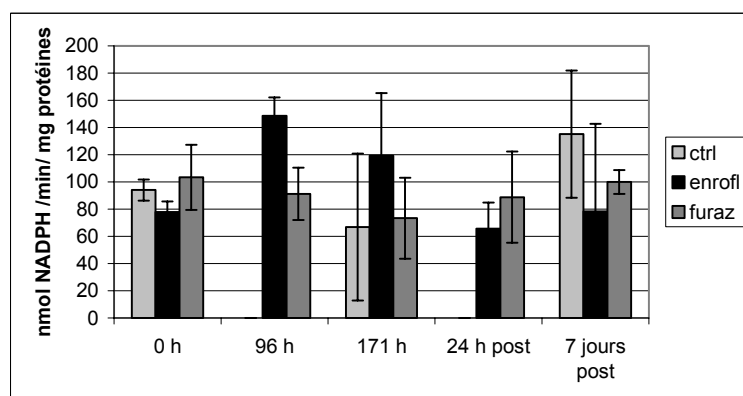


Figure 5 : Activité de la glutathion peroxydase (GPx) en nmol NADPH oxydées min⁻¹ mg⁻¹ protéines dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours).

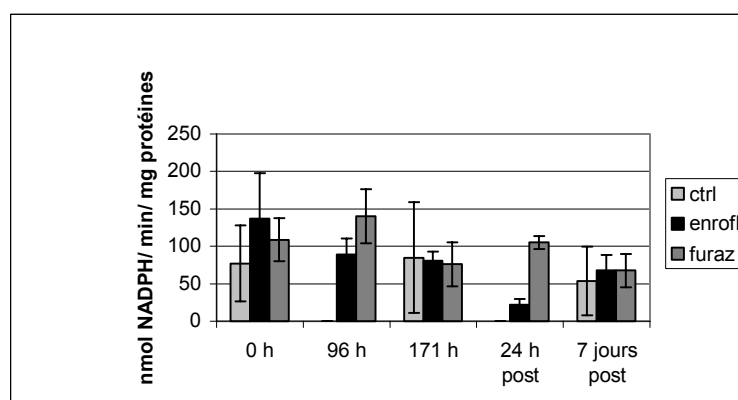


Figure 6 : Activité de la glutathion peroxydase (GPx) en nmol NADPH oxydées min⁻¹ mg⁻¹ protéines dans les branchies la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours).

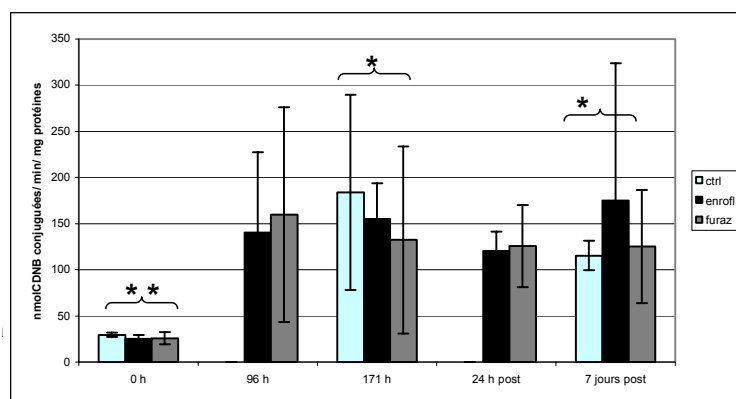


Figure 7 : activité de la glutathion-S-transférase (GST) en nmol CDNB conjuguées $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéines dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours).

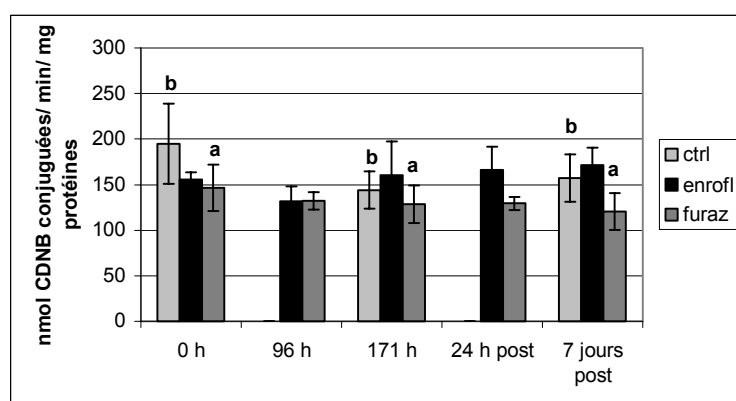


Figure 8 : activité de la glutathion-S-transférase (GST) en nmol CDNB conjuguées $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéines dans les branchies de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours).

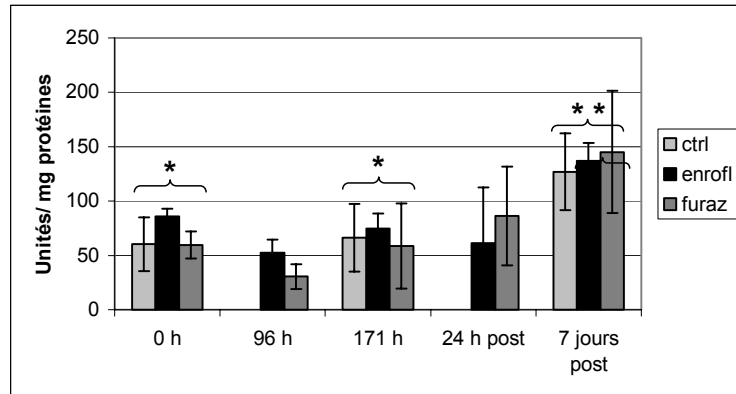


Figure 9: Activité de la superoxyde dismutase totale (SOD) exprimée en unités de SOD mg⁻¹ de protéines dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours).

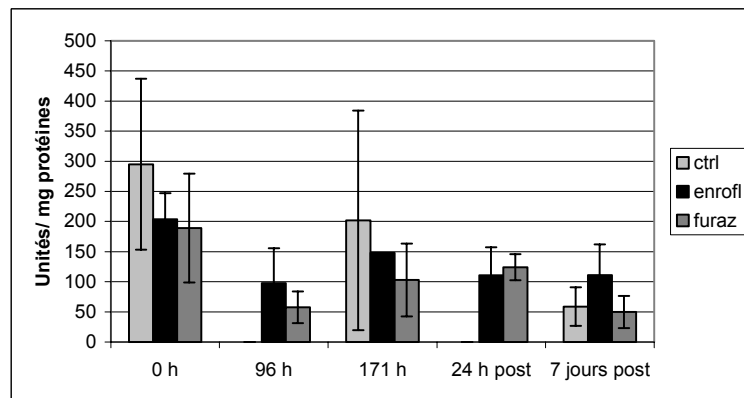


Figure 10 : Activité de la superoxyde dismutase totale (SOD) exprimée en unités de SOD mg⁻¹ de protéines dans les branchies de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours).

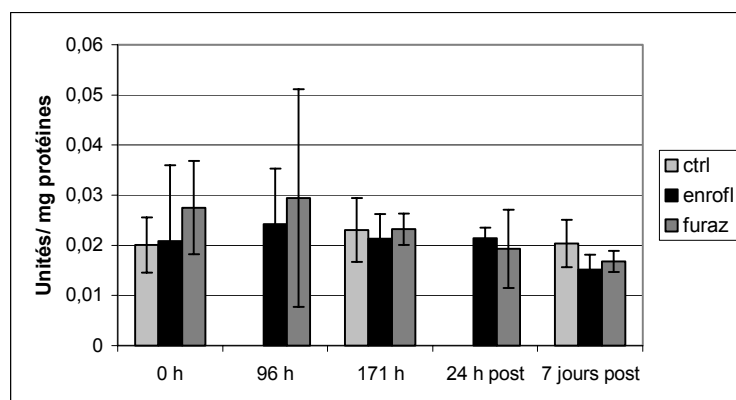


Figure 11: Activité de la catalase exprimée en unités de catalase mg⁻¹ de protéines dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours).

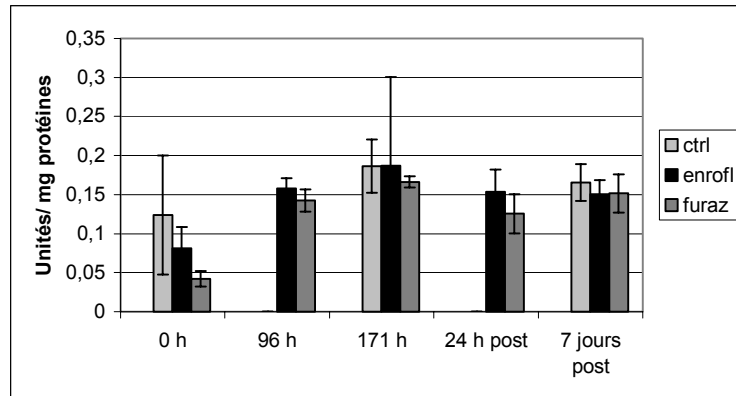


Figure 12 : Activité de la catalase exprimée en unités de catalase mg^{-1} de protéines dans les branchies de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours).

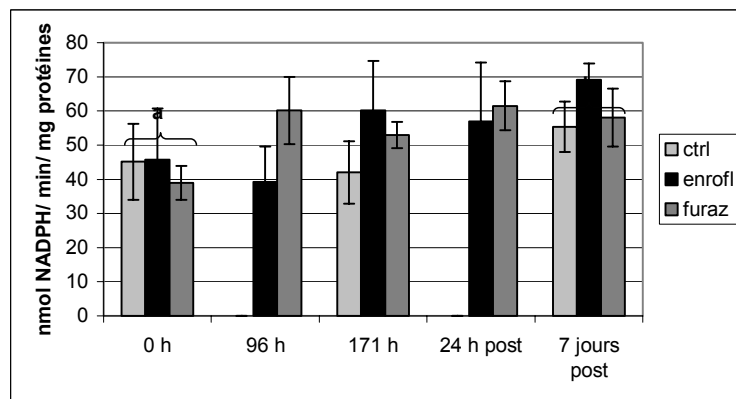
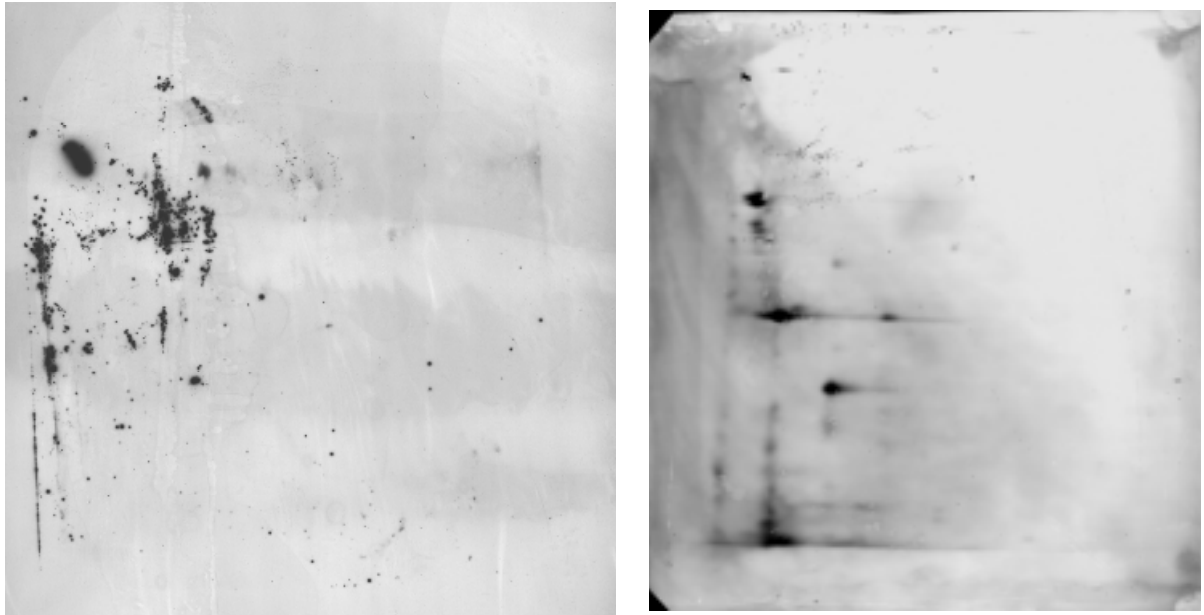
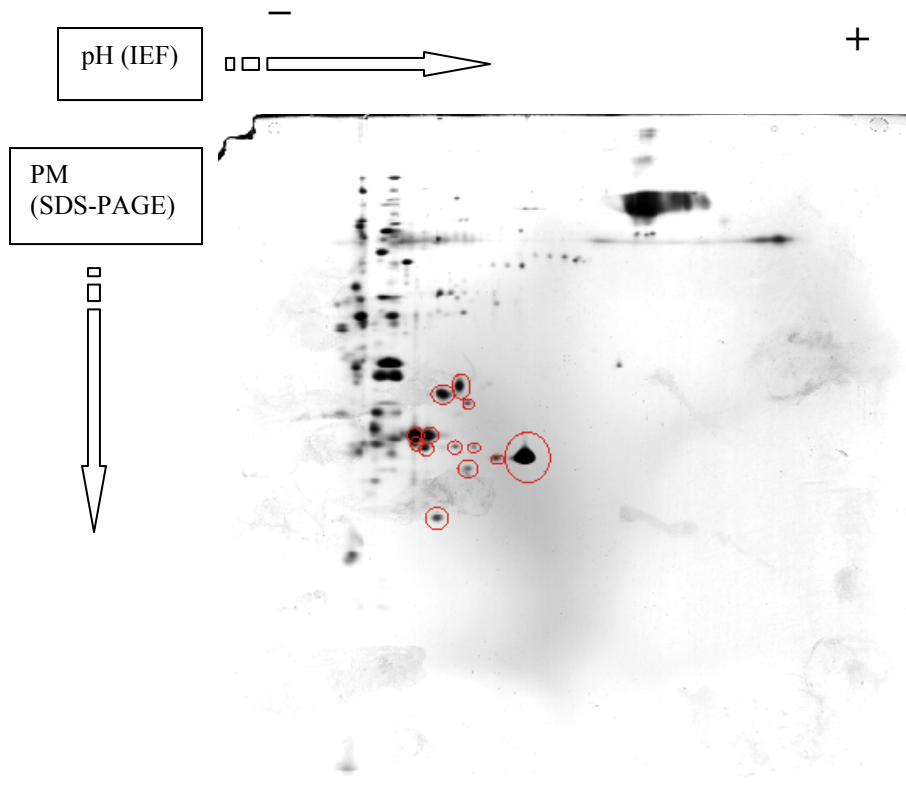


Figure 13: Activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase en $\text{nmol NADPH oxydées min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protéines dans les branchies de la crevette tigrée au cours d'une période de contamination (jusqu'à 171 h) suivie d'une période de décontamination (jusqu'à 7 jours).



**Figure 14 : A gauche : film 1. A droite : membrane de nitrocellulose (1) 200µg
(hépatopancréas de crevettes traitées à l'enrofloxaciné après 171h de contamination)**



**Figure 15 : gel 2a coloré à l'argent
(hépatopancréas de crevettes contrôles après 171h)**

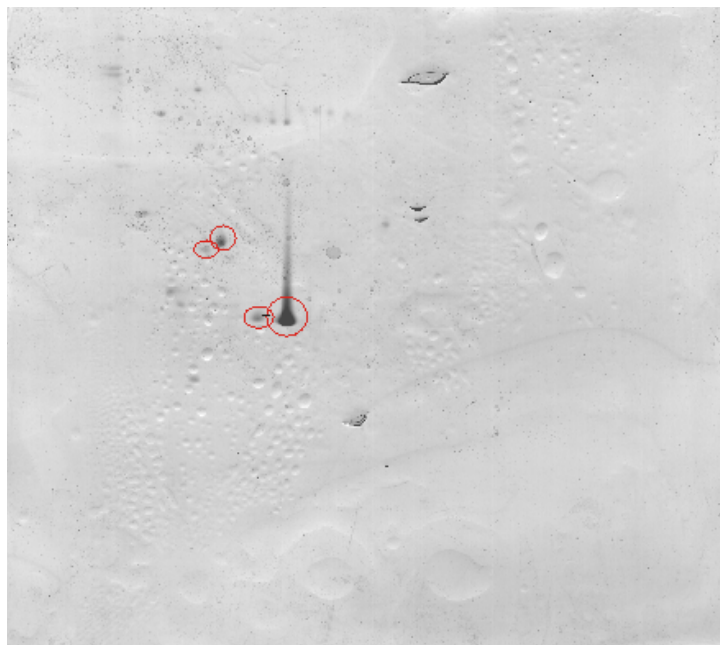
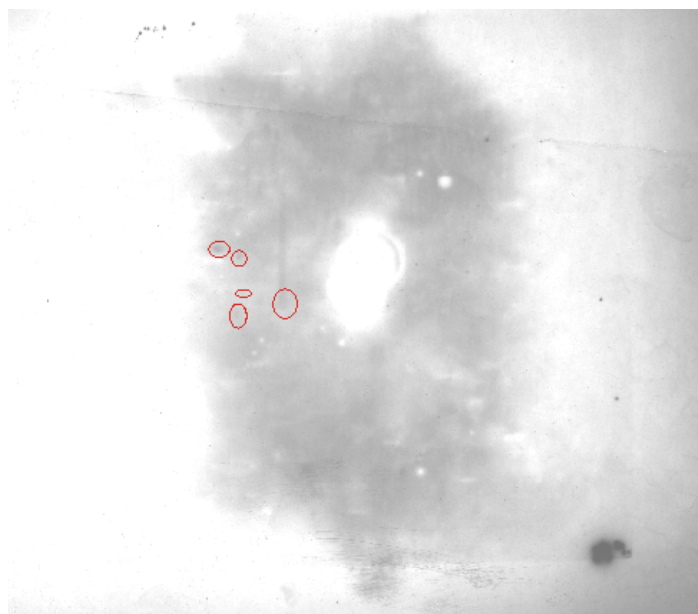


Figure 16 :gel 2b coloré au bleu(hépatopancréas de crevettes contrôles après 171h)



**Figure 17 : Film 2 (10 min d'exposition)
(hépatopancréas de crevettes contrôles après 171h)**

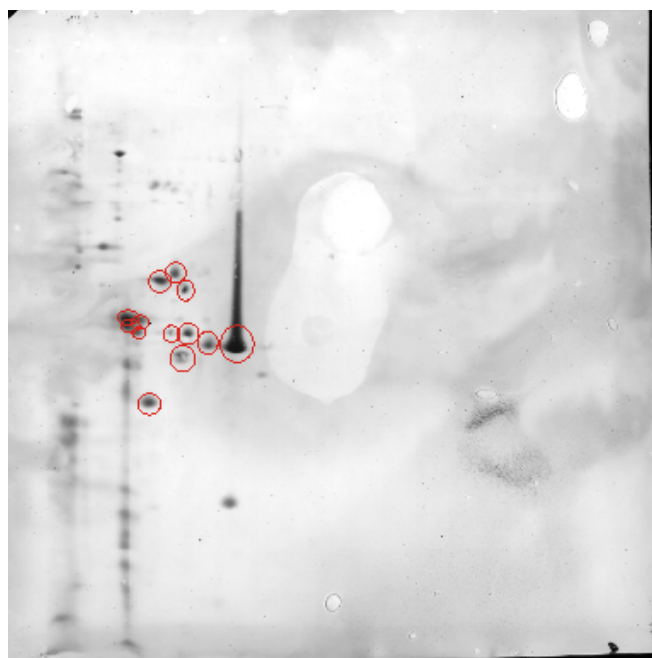
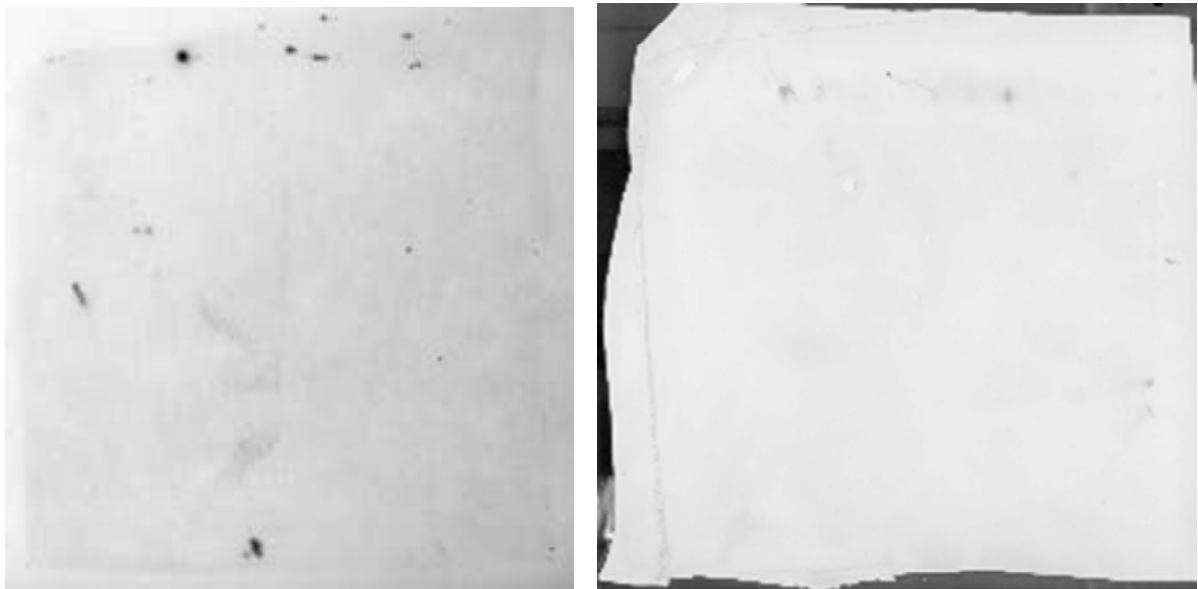


Figure 18 : membrane de nitrocellulose (2) (hépatopancréas de crevettes contrôles après 171h)



**Figure 19. A gauche : Gel 3a coloré à l'argent. A droite : Gel 3b coloré au bleu.
(hépatopancréas de crevettes traitées à l'enrofloxacin après 171h de contamination)**



**Figure 20 : A gauche : film 3 (5min d'exposition). A droite : membrane de nitrocellulose (3)
(hépatopancréas de crevettes traitées à l'enrofloxacin après 171h de contamination)**

Chapitre 4 : Discussion et perspectives

Tableau 1: Concentrations en TBARS (substances réactives à l'acide thiobarbiturique) chez différents organismes et dans différents organes.

Espèce	Organe	Unités	Condition expérimentale	Activité	Référence	
<i>A. antennatus</i>	Cerveau	nmol MDA g ⁻¹ cerveau		60,3- 123,4	(1)	
<i>M rosenbergii</i>	Hépatopancréas	nmol TBARS mg ⁻¹ protéines	Contrôle	Environ 4	(2)	
			+FeSO ₄ (30min)	Environ 14		
	Branchies		Contrôle	Environ 1,5		
			+FeSO ₄ (30min)	Environ 2,5		
<i>W. attu</i>	Foie	nmol TBARS formées g ⁻¹ tissu	Site peu pollué	Entre 20 et 40	(4)	
			Site plus pollué	Entre 20 et 40		
	Rein			Site peu pollué	Entre 40 et 60	
				Site plus pollué	Entre 40 et 60	
	Branchies			Site peu pollué	Environ 60	
				Site plus pollué	Entre 60 et 80	
<i>P. viridis</i>	Hépatopancréas	(nmol MDA formées min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines	A	11,17	(5)	
			B	12,8		
	Branchies	(nmol MDA formées min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines	A	1,62		
			B	2,12		

(1) Crevette marine rouge *Aristeus antennatus* Risso (1816); n=3. D'après Mourente et Díaz-Salvago, 1999.

(2) Crevette géante d'eau douce *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). D'après Dandapat *et al.* , 2000.

(4) Poisson-chat hélicoptère *Wallago attu* Bloch et Schneider (1801) (famille des siluridés). n=5± SE. D'après Pandey *et al.*, 2003.

(5) Moule verte asiatique *Perna viridis* Linné (1758). A : Faible concentration en pesticides organophosphorés et PCB ; B : Concentration importante en pesticides organophosphorés et PCB. D'après Cheung *et al.* , 2002.

Tableau 2: Activités de la glutathion- peroxydase chez différents organismes et dans différents organes

Espèce	Organe	Unités	Condition expérimentale	Activité	Référence
<i>A. antennatus</i>	cerveau	nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines		62,5- 94,5	(1)
<i>M. rosenbergii</i>	Hépatopancréas	nmol NADPH oxydées min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines		Entre 100 et 125	(2)
	Branchies			Un peu plus de 150	
<i>C.maenas</i>	Hépatopancréas			148 ± 17	(3)
	Branchies			111 ± 22	
	Muscles			22 ,7 ± 4 ,9	
<i>W. attu</i>	Foie	nmol NADPH formées min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines	Site peu pollué	259,7	(4)
			Site plus pollué	339,5	
	Rein		Site peu pollué	166,3	(4)
			Site plus pollué	546,0	
	Branchies		Site peu pollué	184,1	(4)
			Site plus pollué	296,8	
<i>M.edulys</i>	Glande digestive	nmol.min ⁻¹ .g ⁻¹ poids sec		604 ± 146	(3)
	Branchies			602 ± 33	
	Muscles			724 ± 240	
<i>P.maximus</i>	Glande digestive			450 ± 151	(3)
	Branchies			269 ± 116	

(1) Crevette marine rouge *Aristeus antennatus* Risso (1816); n=3. D'après Mourente et Díaz-Salvago, 1999.

(2) Crevette géante d'eau douce *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). D'après Dandapat *et al.* , 2000.

(3) Crabe vert *Carcinus maenas* Linné (1758), moule commune *Mytilus edulis* Linné (1758) et coquille Saint-Jacques de l'Atlantique *Pecten maximus* Linné (1758) ; n=4± SEM. D'après Gamble *et al.*, 1994.

(4) Poisson-chat hélicoptère *Wallago attu* Bloch et Schneider (1801) (famille des siluridés). n=5± SE. D'après Pandey *et al.*, 2003.

(5) Moule verte asiatique *Perna viridis* Linné (1758). A : Faible concentration en pesticides organophosphorés et PCB ; B : Concentration importante en pesticides organophosphorés et PCB. D'après Cheung *et al.* , 2002.

Tableau 3 : Activités de la superoxyde dismutase totale chez différents organismes et dans différents organes.

Espèce	Organe	Unités	Condition expérimentale	Activité	Référence
<i>A. antennatus</i>	Cerveau	unités mg ⁻¹ protéines		5,4- 9,2	(1)
<i>M. malcolmsonii</i>	Hépatopancréas	U min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines	Stade subadulte	32,16 ± 0,72	(6)
	Branchies			21,4 ± 0,72	
	Muscles			16,0 ± 0,58	
<i>M. rosenbergii</i>	Hépatopancréas	U mg ⁻¹ protéines		Environ 8	(2)
	Branchies			Environ 7	(2)
<i>C. maenas</i>	Hépatopancréas	Unités de SOD		173 ± 10	(3)
<i>W. attu</i>	Foie	U min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines	Site peu pollué	0,86	(4)
			Site plus pollué	17,3	
	Rein		Site peu pollué	0,40	
			Site plus pollué	1,8	
	Branchies	U min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines	Site peu pollué	0,61 ± 0,1	
			Site plus pollué	11,43 ± 0,5	
<i>M. edulys</i>	Glande digestive	Unités de SOD		615 ± 52	(3)
<i>P. maximus</i>	Glande digestive			324 ± 6	

Tableau 4: Activités de la glucose- 6- phosphate- déshydrogénase dans différents organes chez *W. attu*.

Espèce	Organe	Unités	Condition	Activité	Référence
<i>W. attu</i>	Foie	nmol NADP réduites min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines	Site peu pollué	160,6	(4)
			Site plus pollué	362,8	
	Rein		Site peu pollué	149,1	
			Site plus pollué	157,0	
	Branchies		Site peu pollué	135,2	
			Site plus pollué	172,5	

Tableau 5 : Activités de la catalase chez différents organismes et dans différents organes.

Espèce	Organe	Unités	Condition	Activité	Référence
<i>A. antennatus</i>	Cerveau	μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines		6,0- 67,7	(1)
<i>M. malcolmsonii</i>	Hépatopancréas	μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines	Stade subadulte	49,3 ± 0,8	(6)
	Branchies			27,2 ± 0,4	
	Muscles			38,5 ± 0,3	
<i>C. maenas</i>	Hépatopancréas	nmol min ⁻¹		0,3 ± 0,1	(3)
<i>W. attu</i>	Foie	nmol H ₂ O ₂ consommées min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines	Site peu pollué	156,0	(4)
			Site plus pollué	284,5	
	Rein		Site peu pollué	92,7	
			Site plus pollué	203,1	
	Branchies		Site peu pollué	135,1-	
			Site plus pollué	175,3	
<i>M. edulys</i>	Glande digestive	nmol min ⁻¹		5,9 ± 1,1	(3)
<i>P. maximus</i>	Glande digestive			36,1 ± 0,6	

(1) Crevette marine rouge *Aristeus antennatus* Risso (1816); n=3. D'après Mourente et Díaz-Salvago, 1999.

(2) Crevette géante d'eau douce *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). D'après Dandapat *et al.*, 2000.

(3) Crabe vert *Carcinus maenas* Linné (1758), moule commune *Mytilus edulis* Linné (1758) et coquille Saint-Jacques de l'Atlantique *Pecten maximus* Linné (1758) ; n=4± SEM. D'après Gamble *et al.*, 1994.

(4) Poisson-chat hélicoptère *Wallago attu* Bloch et Schneider (1801) (famille des siluridés). n=5± SE. D'après Pandey *et al.*, 2003.

(6) Crevette d'eau douce de mousson *Macrobrachium malcolmsonii* H. Milne-Edwards (1844); n=5 ± SEM. D'après Arun *et al.*, 1998.

Tableau 6: Activités de la glutathion réductase chez différents organismes et dans différents organes.

Espèce	Organe	Unités	Condition expérimentale	Activité	Référence
<i>A. antennatus</i>	Cerveau	nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines		78- 166	(1)
<i>M. rosenbergii</i>	Hépatopancréas	nmol NADPH oxydées min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines		Environ 5	(2)
	Branchies			Environ 15	(2)
<i>W. attu</i>	Foie	nmol/ NADPH oxydées min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines	Site peu pollué	79,4	(4)
			Site plus pollué	117	
	Rein	nmol/ NADPH oxydées min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines	Site peu pollué	63	(4)
			Site plus pollué	71	
	Branchie	nmol/ NADPH oxydées min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines /	Site peu pollué	51,8	(4)
			Site plus pollué	92,3	
<i>P. viridis</i>	Hépatopancréas	nmol NADPH oxydées min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines	Contamination par des pesticides et PCB	Environ 2	(5)
	Branchies	nmol NADPH oxydées min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines	Contamination par des pesticides et PCB	2- 3	(5)

(1) Crevette marine rouge *Aristeus antennatus* Risso (1816); n=3. D'après Mourente et Díaz-Salvago, 1999.

(2) Crevette géante d'eau douce *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). D'après Dandapat *et al.* , 2000.

(4) Poisson-chat hélicoptère *Wallago attu* Bloch et Schneider (1801) (famille des siluridés). n=5± SE. D'après Pandey *et al.*, 2003.

(5) Moule verte asiatique *Perna viridis* Linné (1758). A : Faible concentration en pesticides organophosphorés et PCB ; B : Concentration importante en pesticides organophosphorés et PCB. D'après Cheung *et al.* , 2002.

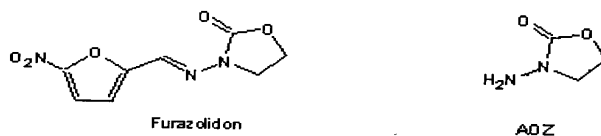


Figure 1 : Formule chimique de la furazolidone et d'un de ses dérivés, la 3-amino-2-oxazolidone (AOZ).

Tableau 7 : Concentrations en glutathion total dans différents organes chez le poisson-chat hélicoptère

<i>W. attu</i>	Foie	nmol GSH consommées g ⁻¹ tissu	Site peu pollué	Environ 6	(4)
			Site plus pollué	Environ 10	
	Rein		Site peu pollué	Znviron 3	
			Site plus pollué	Entre 4 et 6	
	Branchies		Site peu pollué	Environ 1	
			Site plus pollué	Environ 8	

Tableau 8: Activités de la glutathion-S-transférase chez différents organismes et dans différents organes.

Espèce	Organe	Unités	Condition expérimentale	Activité	Référence
<i>A. antennatus</i>	cerveau	nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines		164- 268	(1)
<i>M. malcolmsonii</i>	Hépatopancréas	(μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines)	Stade subadulte	1,16 ± 0,04	(6)
	Branchies			0,38 ± 0,021	(6)
	Muscles			0,67 ± 0,00	(6)
<i>C. maenas</i>	Hépatopancréas	nmol min ⁻¹ g-1 poids sec			(3)
	Branchies				
	Muscles				
<i>W. attu</i>	Foie	nmol conjugués CDNB formées min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines	Site peu pollué	818,5	(4)
			Site plus pollué	1455	
	Rein		Site peu pollué	792	
			Site plus pollué	895,7	
	Branchies		Site peu pollué	927	
			Site plus pollué	1146	
<i>P. viridis</i>	Hépatopancréas	nmol GSH consommées min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines		1,16 ± 0,04	(5)
	Branchies			0,38 ± 0,02	
	Muscles			0,67 ± 0,00	
<i>P.maximus</i>	Glande digestive				(3)
	Branchies				
<i>C. auratus</i>	Foie	Unités mg ⁻¹ protéines		12,9 ± 1,9	(7)
<i>O. mossambicus</i>		mol produites min ⁻¹ mg ⁻¹ protéines	Contrôles	1,9 ± 0,30	(8)
			0,4 → 4 μg /g	2,3 ± 0,56	
			6 → 32 μg /g	3 ± 0,33	

- (1) Crevette marine rouge *Aristeus antennatus* Risso (1816); n=3. D'après Mourente et Díaz-Salvago, 1999.
- (3) Crabe vert *Carcinus maenas* Linné (1758), moule commune *Mytilus edulis* Linné (1758) et coquille Saint-Jacques de l'Atlantique *Pecten maximus* Linné (1758) ; n=4± SEM. D'après Gamble *et al.*, 1994.
- (4) Poisson-chat hélicoptère *Wallago attu* Bloch et Schneider (1801) (famille des siluridés). n=5± SE. D'après Pandey *et al.*, 2003.
- (5) Moule verte asiatique *Perna viridis* Linné (1758). D'après Cheung *et al.* , 2002.
- (6) Crevette d'eau douce de mousson *Macrobrachium malcolmsonii* H. Milne-Edwards (1844); n=5 ± SEM. D'après Arun *et al.*, 1998.
- (7) Poisson rouge *Carassius auratus* Linné (1758). D'après Zhang *et al.*, 2005.
- (8) Tilapia du Mozambique *Oreochromis mossambicus* Peters (1852). D'après Shailaja *et al.*, 2003.

VII) Annexes

1) Homogénéisations :

- **Homogénéisation pour la LPO**

Préparer les produits suivants :

→ Tampon phosphate 50 mM, pH 7,5

→ Inhibiteur de protéase (Sigma P2714 (1 :5 w/v).

(Composition des inhibiteurs de protéases : AEBSF 2 mM, EDTA 1 mM, bestatine 130 μ M, E-64 14 μ M, leupeptine 1 μ M et aprotinine 0,3 μ M).

(Diluer une bouteille dans 10 ml d'eau distillée, puis répartir en 10 aliquots d'un ml.

Diluer un aliquot (1ml) dans 9 ml de tampon phosphate (A).)

-Homogénéiser à raison de 5 ml de tampon (A) par gramme de tissu.

-Conserver à -80°C.

- **Homogénéisation pour le dosage du glutathion total:**

Préparer les produits suivants :

→ Tampon phosphate 50 mM, pH 7,5

→ SSA 5%

→ Inhibiteur de protéase (Sigma):

Diluer une bouteille dans 10 ml d'eau distillée, puis répartir en 10 aliquots d'un ml.

Diluer un aliquot (1ml) dans 9 ml de tampon phosphate (A).

-Homogénéiser à raison de 5 ml de tampon (A) par gramme de tissu.

-Mettre dans chaque tube 500 (ou 250) μ l d'échantillon

-Ajouter dans chaque tube 500 (ou 250) μ l de SSA 5%

-Vortexer puis centrifuger pendant 10 minutes à 1000 X g à 4 °C.

- **Homogénéisation pour tous les autres biomarqueurs:**

Préparer les produits suivants :

→ Tampon phosphate 50 mM, pH 7,5

→ Inhibiteur de protéase (Sigma).

Diluer une bouteille dans 10 ml d'eau distillée, puis répartir en 10 aliquots d'un ml.

Diluer un aliquot (1ml) dans 9 ml de tampon phosphate (A).

-Homogénéiser à raison de 5 ml de tampon (A) par gramme de tissu.

-Centrifuger à 1000 X g pendant 10 minutes à 4 °C

-Conserver le surnageant à -80°C.

- **Homogénéisation et « clean- up » des échantillons (Amersham) (détermination des protéines carbonylées).**

Homogénéiser dans du tampon de lyse (urée 7M, thiourée 2M, Chaps 2 %, SB 3- 10 2%, DTT 1% (1/3 w/v) + IPG 3-11 non linéaire) 1 :3 w/v.

Soniquer (2 fois 30 secondes)

Centrifuger 10 minutes à 12 000 X g.

1. Ajouter du « précipitant » (1 :3 w/v), vortexer, incuber sur glace pendant 15 minutes.
2. Ajouter du « co-précipitant » (1 :3 w/v). Vortexer.
3. Centrifuger à 8 000 X g pendant 10 minutes.
4. Enlever le surnageant en touchant le moins possible le culot.
5. Centrifuger minimum 1 minute (repositionner le tube dans la centrifugeuse exactement comme au point (3)). Retirer le surnageant.
6. Ajouter du « co-précipitant » (3 à 4 fois le volume du culot).
7. Centrifuger 5 minutes à 8000g (repositionner le tube dans la centrifugeuse exactement comme au point (3)). Retirer le surnageant.
8. Recouvrir le culot avec suffisamment d'eau distillée. Vortexer (le culot doit se disperser mais non se dissoudre).
9. Ajouter 1 ml de « tampon de lavage » (conservé à -20 °C au moins une heure avant utilisation) + 5 µl « d'additif de lavage ». Vortexer jusqu'à ce que le culot se disperse.

2) Protocoles des dosages des biomarqueurs

- **Glucose-6- phosphate déshydrogénase (G6PDH)**

D'après la technique décrite par Glock et Mc Lean (1953).

La G6PDH catalyse la production de NADPH via la voie des pentoses phosphates :



Principe : le dosage est basé sur la production de NADPH en présence de NADP^+ et de glucose-6-Phosphate (G6P).

Remarque : l'activité de la G6PDH est surestimée, car l'acide 6- Phosphogluconique produit également du NADPH.

1. Réactifs

- Tampon Tris-KCl 1 M, pH 7,8
→ 121g/1000ml
- MgCl_2 (chlorure de magnésium) 0,2 M ; MM=203 g /mol.
→ 10,15 g MgCl_2 / 250 ml H_2O distillée
- NADP 50 mM ; MM= 765,4g/mol/
→ 76,5mg/ 2ml H_2O distillée (à préparer chaque jour et conserver sur glace)
- G6P (glucose-6-phosphate) 17,89 mM; MM= 340,19 g/mol.
→ 12, 16 mg/ 2ml H_2O distillée (à préparer chaque jour et conserver sur glace)
- Mix G6PDH (20 ml) :
- 2,36 ml tampon Tris-KCl
- 1,2 ml MgCl_2
- 480 μl NADP
- 15,96 ml H_2O distillée

2. Procédure

(Les échantillons sont non dilués)

Réactifs	Blanc spectro	Blanc test Hépatopancréas	Test Hépatopancréas	Blanc test Branchies	Test Branchies
Mix G6PDH (μl)	540 μl	540 μl	540 μl	540 μl	540 μl
H_2O_2 (μl)	360 μl	340 μl	280 μl	340 μl	280 μl
Échantillon (μl)	/	20 μl	20 μl	20 μl	20 μl
G6P (μl)	/	/	60 μl	/	60 μl

Lire la variation d'absorbance à 340 nm pendant 3 minutes.

3) Calcul des activités : (unités/ml) : $\{(\text{Abs test} - \text{abs blanc test}) \times \text{volume total (ml)} \times \text{dilution}\} / 6,22 \times 1 \times \text{volume de l'échantillon (ml)}$

où : $6,22 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-2}$ = coefficient d'extinction micromolaire du NADPH

1 cm= épaisseur de la cuvette

- **Glutathion-S-transférase (GST)**

D'après la technique décrite par Habig *et al.* (1974)

Principe : ce dosage se base sur la conjugaison du glutathion réduit (GSH) avec le 1-chloro-dinitro-benzène (CDNB) par la GST.

1. Réactifs

- a) Tampon HEPES 50mM, pH 7,5
→ 5,95 g/ 500 ml H₂O distillée
- b) GSH (glutathion forme réduite), 50 mM, MM= 307 g/mol.
→ 76,83 mg/ 5ml tampon HEPES.
- c) CDNB (1-chloro- dinitro- benzène), 50 mM;
→ 50,5 mg /5 ml éthanol

Conserver sur glace et protéger de la lumière.

2. Procédure

Hépatopancréas : dilué 5 fois

Branchies : non diluées

Réactifs	Blanc spectro	Test hépatopancréas	Test branchies
Tampon HEPES (μl)	700 μl	700 μl	700 μl
CDNB (μl)	30 μl	30 μl	30 μl
H ₂ O (μl)	240 μl	220 μl	220 μl
GSH (μl)	30 μl	30 μl	30 μl
Échantillon (μl)	/	20 μl	20 μl

Lire la variation d'absorbance à 340 nm pendant 3 minutes.

3. Calcul des activités :

(unités/ml) : $\{(\text{Abs test} - \text{abs blanc test}) \times \text{volume total (ml)} \times \text{dilution} \times 1\} / 0,0096 \times \text{volume de l'échantillon (ml)}$

où : 0,0096 M⁻¹ cm⁻¹ = coefficient d'extinction molaire du NADPH

1 cm = épaisseur de la cuvette

- **Glutathion peroxydase (GPx)**

D'après la technique décrite par Flohé et Günzler (1984) et modifiée par Mohandas *et al.* (1984)

Principe : Le glutathion oxydé (GSSG) formé par la réaction catalysée par la GPx est continuellement réduit par un excès de glutathion réductase (qui maintient un niveau constant de glutathion réduit (GSH). L'oxydation du NADPH lors de la réduction du GSSG est suivie au spectromètre.

1) Réactifs :

Tampon phosphate spécial GPx :

- Tampon phosphate de potassium 100 mM
 - EDTA (acide tétra acétique éthylène diamine (*disodium salt*) 2 mM ; MM= 372,2 g/mol
 - NaN₃ 2 mM ; MM= 65, 01 g/mol.
- pH 7

GR (Glutathion réductase), 20 Unités/ml de tampon phosphate spécial GPx

GSH, 20 mM ; MM= 307,3 g/mol
→ 6,15 mg/ 1ml d'H₂O distillée

NADPH, 2 mM ; MM= 833, 4g/mol
→ 1,66 mg/ ml H₂O distillée

H₂O₂ 5mM (à préparer à partir d'une solution commerciale 30% ; 1,11 kg/l.
→ 2,6μl/ 5 ml H₂O distillée

2) Procédure :

Hépatopancréas : dilution 2 fois

Branchies: dilution 2 fois

Mettre à zéro avec eau distillée

Réactifs	Blanc	Test
Tampon phosphate spécial GPx (μl)	550 μl	550 μl
GR (μl)	100 μl	100 μl
GSH (μl)	100 μl	100 μl
Tampon phosphate d'homogénat (μl)	50 μl	/
Échantillon (μl)	/	50 μl
NADPH (μl)	100 μl	100 μl
Incubation 10 minutes à température ambiante		
H ₂ O ₂ (μl)	100 μl	100 μl

Lire à 340 nm pendant 5 minutes.

3) Calcul des activités (unités/ml) : {(Abs test- abs blanc) x volume total (ml) X dilution X 1} / 6,22 X volume de l'échantillon (ml)

où : 6,22 μmol⁻¹ cm⁻² = coefficient d'extinction micromolaire du NADPH

1 cm= épaisseur de la cuvette

- **Glutathion réductase (GR)**

D'après la technique décrite par Carlberg et Mannervik (1975) et modifiée par Mohandas *et al.*, (1984).

Principe :

Ce dosage est basé sur l'oxydation du NADPH en NADP⁺, réaction catalysée par une concentration limitante en GR.

1) Réactifs :

a) Tampon phosphate 100 mM + EDTA 0,5 mM, pH 7,6

b) GSSG (glutathion forme oxydée), 20 mM ; MM= 612,63 g/mol
→ 12,25 mg/ 1ml d'H₂O distillée

c) NADPH 2 mM ; MM= 833,4g/mol
→ 1,66 mg/ ml H₂O distillée.

2) Procédure

Réactifs	Blanc	Test
Tampon phosphate spécial GR (μl)	650 μl	650 μl
GSSG (2 mM final) (μl)	100 μl	100 μl
NADPH 0,2 Mm final (μl)	/	100 μl
H ₂ O (μl)	100 μl	/
Incubation 10 minutes à 30 °C (ou à température ambiante)		
Échantillon (μl)	150 μl	150 μl

Lire à 340 nm pendant 5 minutes

L'activité GR est exprimée en nmol de NADPH oxydées par minute par mg de protéines.

- **Peroxydation lipidique (LPO)**

D'après la technique décrite par Fatima *et al.*, 2000).

Principe :

Les TBARS (substances réactives à l'acide thio-barbiturique) ajoutées à l'échantillon réagissent avec le MDA (malondialdéhyde). Le produit de cette réaction est lu à 535 nm.

La courbe standard (avec différentes concentrations de MDA) permet d'évaluer la peroxydation lipidique (exprimée en nmol d'équivalent de MDA /g de tissu).

1) Réactifs

Acide trichloroacétique 5% (TCA) ; MM= 163,39 g/mol

→ 5g TCA dans 100 ml H₂O distillée

(A préparer chaque jour et à conserver sur glace).

Diméthyl sulfoxyde (DMSO) ; MM=78,13 g/mol

Acide thiobarbiturique (minimum 98%) (TBA) ; MM= 144,15g/mol.

→ 67 mg TBA dans 1 ml DMSO → mélanger → ajouter 9ml d' H₂O distillée.

(Protéger de la lumière)

Éthanol ; MM= 46,07 g/mol

1, 1, 3, 3,-tétraméthoxypropane 99% Malonadéhyde bis (diméthyl acétal) 99% (TMOP), 500 µM

→ 4,167µl dans 1 ml éthanol (mélanger) → ajouter environ 49 ml d' H₂O distillée (pour obtenir un volume total de 50 ml).

2) Procédure

Courbe d'étalonnage

Numéro du standard	Concentration en MDA	Dilutions	Volume d'eau
Solution stock	500 µM		
1	100 µM	1ml (solution stock)	4 ml
2	50 µM	2 ml (standard n° 1)	2 ml
3	10 µM	1 ml (standard n° 2)	4 ml
4	5 µM	2 ml (standard n° 3)	2 ml
5	2,5 µM	2 ml (standard n° 4)	2 ml
6	1,25 µM	2 ml (standard n° 5)	2 ml
7	0,625 µM	2 ml (standard n° 6)	2 ml
8	0 µM	/	1 ml

Prendre 1 ml de chaque tube et conserver sur glace

- Ajouter 1 ml TCA 5% dans chaque tube
- Incubation 5 minutes sur glace
- Ajouter 1 ml TBA 0,67 % dans chaque tube
- Incubation dans eau bouillante pendant 10 minutes
- Lire à 535 nm (avec de l'eau distillée comme zéro).

Échantillons

Hépatopancréas : dilution 5 fois (100 μ l échantillon + 400 μ l tampon phosphate d'homogénat)

Branchies : Dilution 2 fois (250 μ l+ 250 μ l)

Hémolymphe : dilution 10 fois (50 μ l+ 450 μ l)

- 500 μ l échantillon dans un petit tube
- Ajouter 500 μ l TCA 5%
- Incubation 15 minutes sur glace
- Ajouter 500 μ l TBA 0,67%
- Centrifuger à 2 200 X g pendant 10 minutes
- Placer le surnageant dans de l'eau bouillante pendant 10 minutes
- Conserver à température ambiante
- Lire à 535 nm (avec de l'eau distillée comme zéro).

- **Catalase**

D'après une technique décrite par Baudhuin *et al.*, 1964).

Principe : Il s'agit d'une méthode colorimétrique. Le TiOSO_4 (oxysulfate de titane) réagit avec l' H_2O_2 qui n'a pas été réduit par la catalase après 6 minutes.

1) Réactifs :

1) « *Blank mixture* » (BC) :

Tampon imidazole 0,2M pH 7 (100 ml)

+ 1g BSA

+ H_2O (900 ml/l)

1) (*A préparer au moins un jour avant le dosage*)

Préparer une solution stock de TiOSO_4 : 1,7 g dans 500 ml H_2SO_4 2N.

Faire bouillir pendant 10 minutes.

Laisser reposer jusqu'au lendemain.

Diluer 1,5 fois dans H_2SO_4 et filtrer sur du papier Whatman.

2) Tween 20 (6,56 %)

3) Tampon phosphate 50 mM pH 7,5

4) H_2O_2 30 %

2) Procédure :

1) Essai de la quantité d' H_2O_2 qui doit être ajoutée au « BC ».

→ Essayer avec 40 μl d' H_2O_2 dans 250 μl de BC (= *Sample mixture* = SC).

Directement dans la cuvette : 0,75 ml TiOSO_4 dans 1,3 ml SC.

Lire à 420 nm. L'absorbance obtenue est l'absorbance maximale possible et doit être comprise entre 0,75 et 0,95. Si pas, ajuster le volume d' H_2O_2 .

2) Hépatopancréas : dilution 2 fois.

Branchies : dilution 10 fois.

Réactifs	Blanc 1	Blanc 2	Blanc test hépatopancréas	Test hépatopancréas	Blanc test branchies	Test branchies
SC	/	1250 μl	/	1250 μl	/	1250 μl
BC	1250 μl	/	1250 μl	/	1250 μl	/
Tween (0,04 mM final)	12,5 μl	12,5 μl	12,5 μl	12,5 μl	12,5 μl	12,5 μl
Tampon phosphate	37,5 μl	37,5 μl	12,5 μl	12,5 μl	32,5 μl	32,5 μl
Echantillon	/	/	25 μl	25 μl	5 μl	5 μl
Incubation exactement 6 minutes à 0 °C (sur glace au frigo)						
TiOSO_4	750 μl	750 μl	750 μl	750 μl	750 μl	750 μl

Incubation 5 minutes à température ambiante

Lecture 420 nm.

- **Dosage du glutathion total (GSH+ GSSG)**

Principe :

Le GSH (glutathion réduit) réagit avec le DTNB (absorbance 412 nm). Le glutathion oxydé (GSSG) doit être réduit en GSH via la glutathion réductase en présence de NADPH.

1) Réactifs :

1) Tampon phosphate :

KH_2PO_4 200 mM

+ EDTA 0,1 mM

→ pH 7,5

2) NADPH 2 mM dans H_2O

3) DTNB 1,5 mM dans H_2O

4) SSA 2,5% (2,5g SSA dans 100 ml H_2O)

5) GR : 50 U/ml tampon phosphate (solution stock)

6) GSH: 150 μl GSH 100 μM + 850 μl SSA 1%

2) Procédure

A) Courbe standard:

Réactifs	0 pmol	60 pmol	120 pmol	180 pmol	240 pmol	300 pmol
Tampon phosphate	510 μl	510 μl	510 μl	510 μl	510 μl	510 μl
NADPH	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
DTNB	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
H_2O	260 μl	260 μl	260 μl	260 μl	260 μl	260 μl
SSA 1%	20 μl	16 μl	12 μl	8 μl	4 μl	0 μl
GSH 15 μM	0 μl	4 μl	8 μl	12 μl	16 μl	20 μl
GR	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl

B) Echantillons

Réactifs	Blanc (hépatopancréas ou branchies)	Test (hépatopancréas ou branchies)
Tampon phosphate	700 μl	700 μl
NADPH	100 μl	100 μl
DTNB	100 μl	100 μl
Echantillon	/	60 μl
SSA 1%	60 μl	/
GR	40 μl	40 μl

• Dosage de la SOD

La technique est adaptée d'après Mockett *et al.* (2002).

Principe:

Il s'agit d'une technique qui permet de déterminer l'activité SOD totale. Le couple xanthine-xanthine oxydase génère de l' $O_2^{\bullet-}$ (anion superoxyde). Cet anion réduit le NBT en nitrobleu diformazan (lu à 560 nm). La SOD transforme le $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 et donc moins de NBT peut réagir avec l'anion superoxyde, d'où une diminution de la couleur bleue dans la cuvette.

1) Réactifs :

1. Tampon phosphate 50 mM pH 7,5
+ DTPA 1,33 mM (496,5 g dans 950 ml tampon)
+ BSA 0,2 mg/ ml (190 mg/ 950 ml tampon)
2. Catalase 40 U/ ml (de tampon phosphate SOD)
3. NBT : 2,24 mM (18,32 mg/ 10 ml Tampon phosphate homogénat)
4. BCS : 10 mM (11,29 mg/ 2ml Tampon phosphate homogénat)
5. Xanthine 1,8 mM (3,24 mg/ 12 ml) + NaOH 1 N pour dissoudre la xanthine
6. XOD : 15 μ l / 1ml tampon phosphate SOD

Préparer un "mix":

132 ml tampon phosphate SOD

5 ml catalase

5 ml NBT

17ml xanthine

1 ml BCS.

2) Procédure:

1. XOD:

Réactifs	Blanc	Test 20 μ l	Test 25 μ l	Test 50 μ l
Mix	800 μ l	800 μ l	800 μ l	800 μ l
Tampon phosphate d'homogénat	200 μ l	180 μ l	175 μ l	150 μ l
XOD	/	20 μ l	25 μ l	50 μ l

Lecture à 560 nm pendant 6 minutes → l'absorbance doit être comprise entre 0,02 et 0,03.

Si pas, ajuster la quantité de XOD.

2. Echantillons (par exemple : si la quantité de XOD choisie est de 25 μ l)

L'hépatopancréas est dilué 10 fois, les branchies 15 fois et l'hémolymph 15 fois.

Réactifs	10 μ l	25 μ l	50 μ l	75 μ l	100 μ l
Mix	800 μ l	800 μ l	800 μ l	800 μ l	800 μ l
Tampon phosphate d'homogénat	165 μ l	150 μ l	125 μ l	100 μ l	75 μ l
Echantillon	10 μ l	25 μ l	50 μ l	75 μ l	100 μ l
XOD	25 μ l	25 μ l	25 μ l	25 μ l	25 μ l

Lecture à 560 nm pendant 6 minutes.

- **Dosage des protéines (Lowry)**

Réactifs :

- NaOH 1 N
- Na₂ CO₃ 2%
- Tartrate Na⁺/ K⁺ (2%)
- Cu SO₄ (1%)
- Réactif de Folin (à diluer 2 fois)

Préparation du Mix :

- 100ml Na₂ CO₃
- 1ml tartrate Na⁺ /K⁺
- 1ml Cu SO₄

Courbe d'étalonnage :

- 0 ; 5 ; 10 ; 20 et 50 µl d'étalon (dans des grands tubes)
- Ajouter eau distillée pour obtenir un volume total de 500 µl.
- Ajouter 500 µl de NaOH dans chaque tube
- Incubation 30 à 120 minutes à température ambiante
- Ajouter 5 ml du mix dans chaque tube
- Incubation 15 minutes à température ambiante
- Ajouter 500 µl de Folin dans chaque tube
- Incubation 30 minutes à température ambiante
- Lire l'absorbance à 660 nm.

Échantillons

- 500 µl de l'échantillon dilué
- 500 µl de NaOH 1N
- Incubation 30 min à 120 min à température ambiante
- Ajouter 5 ml du mix dans chaque tube
- Incubation 15 minutes à température ambiante
- Ajouter 500 µl de Folin dans chaque tube
- Incubation 30 minutes à température ambiante
- Lire l'absorbance à 660 nm.

- **Dosage des protéines (Bradford)**

- Diluer 5X la BSA dans du tampon de lyse
- Diluer 5X la solution de Biorad dans H₂O distillée

	Blanc 1	Blanc 2	Etalon	Echantillon
Tampon de lyse	1 µl	10µl		
BSA			10µl	
Echantillon				1µl
Solution Biorad	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

Vortexer puis attendre 5 minutes avant de lire l'absorbance à 595 nm

3) Analyse des résidus d'antibiotiques dans les muscles

- **Quinolones (enrofloxacin)**

A) *Extraction* :

1. Peser environ $1 \pm 0,05$ g de muscle homogénéisé.
2. Ajouter 10 ml d'acétonitrile (pour HPLC)
3. Ajouter 1 ml de solution CC1 pour le point 1 de la courbe standard, 1ml de CC2 pour le point 2 etc. jusqu'au point 6.
4. Ajouter 1ml de standard interne pour chaque échantillon
5. Fermer tous les tubes
6. Vortexer 1 minute.
7. Mélanger sur un agitateur rotatif pendant 15 minutes
8. Centrifuger 10 minutes à 1000 X g (à température ambiante)
9. Transférer le surnageant dans de nouveaux tubes
10. Evaporation (sous N₂) à 37°C jusqu'à séchage de l'échantillon.

B) *Purification*

11. Ajouter 2 ml de tampon NH₄Ac
12. Vortexer 15 secondes
13. Soniquer 15 minutes
14. Numéroter les « cartidge » SPE et les placer dans le « VacMaster ».
15. Conditionnement des « cartidges » :
16. 2 x 1 ml méthanol
17. 2x 1 ml H₂O
18. 2x 1 ml de tampon NH₄Ac
19. Ajouter des nouveaux tubes en verre dans le « VACMASTER3
20. Verser tout l'échantillon dans chaque « cartidge ».
21. Eluer avec 4x 1 ml de solvant d'élution. Le solvant est complètement collecté.
22. Evaporation (sous N₂) à 37°C jusqu'à séchage de l'échantillon
23. Ajouter 300 µl d'acide formique pH 2,5
24. Vortexer chaque tube 15 s.
25. Transférer via un filtre dans un vial avec un insert
26. Fermer chaque vial et vortexer pour éliminer les bulles d'air.
27. Conserver les échantillons au frigo jusqu'à l'analyse LC-MS.

C) *Analyse LC-MS (chromatographie liquide-spectromètre de masse)*

La chromatographie (HPLC= chromatographie liquide à haute performance) se réalise sur une colonne « X-Terra » (150x 2,1 mm, 3,5µm) Waters et la colonne de garde est une colonne X-Terra (150 x 10 mm, 3,5µm) Waters. Les solvants utilisés sont du méthanol (A) et un mélange H₂O+ NH₃ 0,1 % (B). Le gradient se réalise comme suit :

Temps	% A	% B	Flux
0 min	10	90	0,25 ml/min
17 min	10	90	0,25 ml/ min

Le volume d'injection est de 20 µl (sans « split »)

Voici les paramètres de spectrométrie de masse (MS)

MS	
Mode	ES-(CAP, TAP, FF) et ES+ (FFA)
Gaz de désolvation	620 l/h
Gaz du cône	150 l/h
Gaz de collision	2. 10 ⁻³ mbar
Capillaire	3,2 kV
Température de la source	125 °C
Température de désolvation	250 °C
Multiplier	650 V
Transitions	CAP : 321>152 (14 eV) 321>257 (9 eV) CAP-d5 : 326>157 (14 eV) TAP : 355>186 (20 eV) 355>337 (10 eV) FF : 357>186 (15 eV) 357>337 (10 eV) FFA : 248>130 (20 eV) 248> 230 (10 eV)
Temps de rétention	CAP : 10,02 min CAP-d5 : min TAP : 7,51 min FF : 8,90 min FFA : 4,75 min

- **Nitrofuranes (furazolidone)**

Pour la chromatographie liquide, les colonnes utilisées sont des «Waters 2690 LC» et pour la spectrométrie de masse, les colonnes sont des « Quattro Ultima Pt MS »

Chromatographie liquide (LC) : Colonne Waters Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 µm) avec une colonne de garde «Symmetry».0, 4 ml/min, acétonitrile/ eau (+ 0,1 % d'acide acétique), avec un gradient de 10/90, split 1 :1

Spectrométrie de masse : ESI+, MS/ MS en mode MRM